TRANSKRIPTION DER ⌀X174 DNA DURCH DIE RNA POLYMERASEN AUS MICROCOCCUS LUTEUS UND ESCHERICHIA COLI UND DER DIRIGIERENDE EINFLUSS DER UNTEREINHEIT SIGMA

Heinrich Ernst

1981

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547022_0042

TRANSKRIPTION DER ØX174 DNA DURCH DIE RNA POLYMERASEN AUS MICROCOCCUS LUTEUS UND ESCHERICHIA COLI UND DER DIRIGIERENDE EINFLUSS DER UNTEREINHEIT SIGMA

Dissertation der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Heinrich Ernst

eingereicht am 23. Juni 1981

München 1981

1. Berichterstatter: Prof. Dr. G. R. Hartmann

2. Berichterstatter: Prof. Dr. E.-L. Winnacker

Tag der mündlichen Prüfung: 27. Juli 1981

UNIV. LEIDEN BIBL.

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

Die vorliegende Arbeit wurde von Mai 1978 bis Juni 1981 auf Anregung und unter Anleitung von Herrn Professor Dr. G. Hartmann am Institut für Biochemie der Ludwig-Maximilians-Universität München ausgeführt.

Herrn Professor H. J. Gross, Universität Würzburg, und Herrn Dr. H. Domdey, Lausanne, danke ich für die Durchführung der RNA-Sequenzanalyse und für weitere wertvolle Hinweise.

Frl. Dr. Ch. Leib und Frau S. Klüpfel-Stahl danke ich für die Überlassung der RNA Polymerase-Präparationen.

Ferner möchte ich allen Institutsangehörigen danken, die durch Anregungen und praktische Hilfe diese Arbeit unterstützt haben.

Inhaltsverzeichnis

Einleitung 1

Material und Methoden 5

Material 5

1. RNA Polymerase-Präparationen 5
2. Nukleinsäuren 6
3. Desoxyribonukleasen 6
4. Ribonukleasen 7
5. Nukleotide 8
6. Chromatographiematerialien 8
7. Materialien für Elektrophoresen 8
8. Membranfilter 9
9. Färbematerialien und Filme 9
10. Sonstige Chemikalien 9
11. Geräte 10

Methoden 11

1. Gelelektrophoresen 11
   - 1.1. Agarose-Gelelektrophorese 11
   - 1.2. 2.5 % Acrylamid - 0.5 % Agarose-Gele 11
   - 1.3. Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur Auftrennung von RNA unter denaturierenden Bedingungen 13
   - 1.4. Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur Sequenzierung γ-^{32}P-markierter RNA 13
2. DNA-Abbau mit Restriktionsenzymen 15
3. Isolierung von Restriktionsfragmenten 15
4. *In vitro*-RNA-Synthese 16
5. RNA-DNA-Hybridisierung 17
6. Filterbindung von RNA Polymerase-DNA-Komplexen 19

7. RNA-Sequenzanalyse 20

7.1. Spezifische Initiation mit Dinukleotiden 20

7.2. Synthese und Isolierung γ-^{32}P-markierter RNA 21

7.3. Ermittlung der 5'-terminalen Nukleotide durch zweidimensionale Auftrennung von Oligonukleotiden ("mobility shift"-Methode) 22

7.4. RNA-Sequenzanalyse durch spezifische enzymatische Partialspaltung und Polyacrylamidgelelektrophorese 26

8. Autoradiographie und Auswertung von Gelen 28

Ergebnisse 29

A. Vergleichende Transkription von DNA-Fragmenten, die Promotoren der E.coli RNA Polymerase enthalten, durch die RNA Polymerase aus M.luteus 29

1. Fragmente mit dem øX174 Gen - A-Promotor 29

1.1. Fragment HindII/4 29

1.2. Fragment Hae III/2 32

2. Untersuchung eines Fragments mit dem øX174 Gen B - Promotor 32

3. Fragmente mit dem øX174 Gen D - Promotor 36

3.1. Fragment Taq I/4 36

3.2. Fragment Hae III/3 39

B. Analyse von Transkripten durch Hybridisierung an Restriktionsfragmente 43

1. Transkripte von HindII-Fragmenten 43

2. Transkripte der linearisierten øX174 RF DNA 46

C. Untersuchung der RNA Polymerase-DNA-Wechselwirkung durch Bindung an Restriktionsfragmente 49

1. Bindung an øX174 HindII-Fragmente 50

2. Bindung an øX174 Alu I-Fragmente 52

3. Bindung an øX174 Hae III-Fragmente 54

D. Transkription von Restriktionsfragmenten mit hoher Spezifität in der RNA Polymerase-DNA-Bindung 57

1. Transkription des Fragments Hae III/7 57

2. Vergleich der RNA-Syntheseraten 59

3. Einfluß der Salzkonzentration auf die Transkriptionsspezifität 60

4. Lokalisierung der RNA ^{H}E auf dem ØX174-Genom 63

4.1. Transkription der Restriktionsfragmente Alu I/1, Mbo II/7 und Taq I/5 63

4.2. Eingrenzung der Startstelle der RNA E anhand der Transkriptlängen 68

5. Ermittlung der Startstelle der RNA ^{H}E auf dem ØX174-Genom 74

5.1. Bestimmung des Startnukleotids 74

5.2. Spezifische Initiation mit Dinukleotiden 78

5.3. Sequenzierung des 5'-terminalen Bereichs der RNA ^{H}E 83

E. Transkriptionsspezifität eines Enzym-Hybrids aus E.coli Core-Polymerase und M.luteus σ 88

1. Stimulation der Transkriptionsaktivität von E.coli Coreenzym durch M.luteus σ 88

2. Transkription des Restriktionsfragments Hae III/7 durch das Enzym-Hybrid 89

3. Kompetition zwischen $^{e}\sigma$ und $^{m}\sigma$ 93

4. Nachweis der Identität der spezifischen Hae III/7-Transkripte mit M.luteus Holo-Polymerase und dem Enzym-Hybrid aus E.coli Coreenzym und M.luteus σ 95

4.1. Vergleich der Startnukleotide 95

4.2. Spezifische Initiation mit Dinukleotiden 96

4.3. Vergleich eines partiellen RNase-Abbaus der 5'-markierten RNAs 98

Diskussion 101

Literaturverzeichnis 116

Zusammenfassung 125

Abkürzungsverzeichnis 127

Lebenslauf

Einführung und Problemstellung

Die Regulation der Genexpression in Prokaryonten erfolgt zum großen Teil auf der Ebene der Transkription von DNA in RNA, einer komplexen Reaktion, die in Bakterien durch ein einziges Enzym, die DNA-abhängige RNA Polymerase (EC 2.7.7.6.) katalysiert wird. Die Synthese von RNA wird kontrolliert durch die Interaktion der RNA Polymerase mit spezifischen DNA-Abschnitten, die das Enzym als Startsignale (Promotoren) bzw. Stopsignale (Terminatoren) der RNA-Synthese erkennt.

Besonders eingehend untersucht wurden die Erkennung bestimmter DNA-Sequenzen durch RNA Polymerase und die Wechselwirkungen zwischen Enzym und DNA im Falle der RNA Polymerase aus dem gramnegativen Organismus Escherichia coli (Rosenberg und Court, 1979). Vergleichsweise wenig ist dagegen bekannt, inwieweit solche regulatorischen DNA-Sequenzen von RNA Polymerasen aus verschiedenen Bakterien gleichermaßen erkannt werden, d.h., in welchem Maß Unterschiede in den Proteinstrukturen verschiedener RNA Polymerasen sich in Spezifitäten in der Erkennung von DNA-Signalsequenzen ausdrücken.

Zur Untersuchung von Transkriptionsspezifitäten stellt die an unserem Institut angereicherte RNA Polymerase aus dem grampositiven Bakterium Micrococcus luteus (Lill et al., 1977) im Vergleich zur RNA Polymerase aus E.coli einen besonders interessanten Fall dar, da sich die beiden Bakterien in taxonomischen Merkmalen wie zum Beispiel dem GC-Gehalt ihrer DNA (Belozersky und Spirin,1960) deutlich unterscheiden.

Die RNA Polymerasen aus M.luteus und E.coli zeigen beide den für eubakterielle RNA Polymerasen charakteristischen

Aufbau aus zwei großen, nicht identischen Untereinheiten β und β' und zwei kleinen identischen Untereinheiten α, die zusammen das Coreenzym bilden, sowie einer vom Holoenzym abdissoziierbaren Untereinheit σ, die zur korrekten Initiation der RNA-Synthese notwendig ist (Travers und Burgess, 1969).
Durch Austausch gereinigter Untereinheiten der beiden RNA Polymerasen lassen sich katalytisch aktive Enzym-Hybride erzeugen (Lill, Behrendt und Hartmann, 1975); damit sollte es auch möglich sein, den Einfluß einzelner Untereinheiten auf die Transkriptionsspezifität zu untersuchen.

Um die Erkennung einzelner Promotoren durch die beiden RNA Polymerase-Spezies vergleichen zu können, wurden definierte Restriktionsfragmente der replikativen Form DNA des Bakteriophagen øX174 als Matrize zur Transkription verwendet.
øX174 RF DNA ist aufgrund zahlreicher Untersuchungen besonders gut charakterisiert (vgl. Sanger et al., 1977). Bei der Transkription von øX174 RF I DNA durch RNA Polymerase aus E.coli im in vitro-Transkriptionssystem wird die Synthese von 3 prominenten RNA-Spezies beobachtet (N. Axelrod, 1976a; Smith und Sinsheimer, 1976; Kapitza et al., 1979). Smith und Sinsheimer (1976) ermittelten die Nukleotidsequenz des 5'-terminalen Bereichs dieser 3 Transkripte und bestimmten durch Hybridisierungsexperimente deren Startregionen auf Restriktionsfragmenten.
Die vollständige Sequenzierung der øX174 DNA durch Sanger et al. (1977) ermöglichte schließlich eine exakte Festlegung der RNA-Initiationsstellen (vgl. Fig. 1.). Eine von Robley et al. (1980) ausgeführte elektronenmikroskopische Kartierung von øX174-Promotoren konnte diese Befunde bestätigen.
Hayashi et al. (1976) analysierten die in vivo øX174 mRNAs und konnten 13 diskrete RNA-Spezies unterschiedlicher Länge nachweisen. Den Versuch einer Korrelation von in vivo-

mRNAs und in vitro-Transkripten unternahmen Kapitza et al. (1979). Durch Zusatz des Terminationsfaktors Rho (Richardson, 1971) und RNase III zum in vitro-Transkriptionssystem erhielten die Autoren bei der gelelektrophoretischen Analyse ein RNA-Muster, das in der Anzahl wie in der Längenverteilung der Transkripte dem von Hayashi gefundenen sehr ähnlich ist.

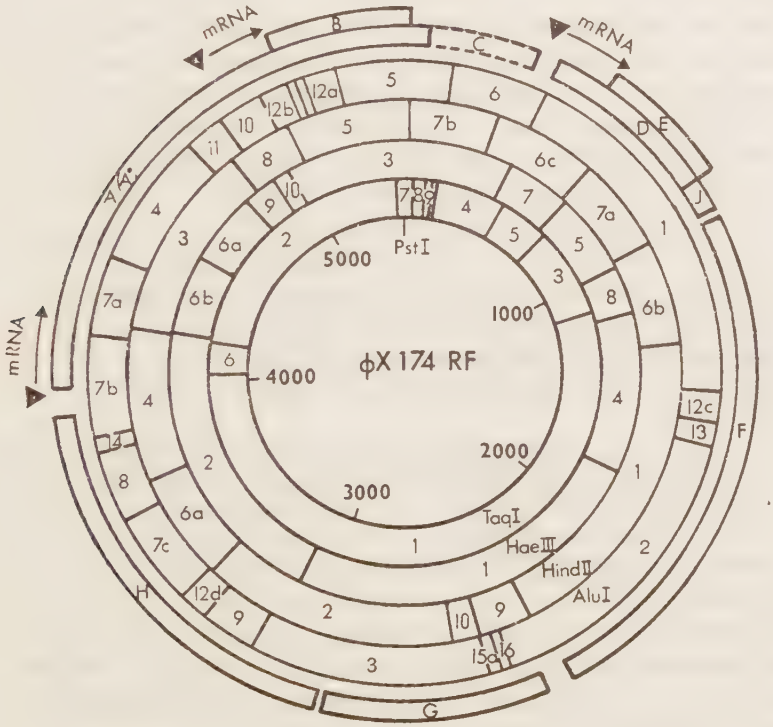


Fig. 1. Genkarte von ϕX174 RF DNA

Die Karte zeigt die Anordnung der Gene auf dem Phagengenom sowie die Schnittstellen der Restriktionsenzyme Alu I, HindII, Hae III und Taq I. Die bekannten Startpunkte von drei in vitro mRNAs sind mit Pfeilen markiert.
(Nach Sanger et al., 1977)

Die drei *in vitro* definierten Initiationsorte der ØX174-Transkripte liegen auf der Genkarte des Bakteriophagen vor den Genen A, B und D (Fig. 1.). Ein Gen ist hier, wie auch im Folgenden, definiert als ein Abschnitt auf der DNA, der, in einem bestimmten Raster gelesen, für ein bestimmtes Polypeptid kodiert.

Veränderungen in der Sekundärstruktur der DNA-Matrize, wie sie bei der Spaltung der superhelikalen RF DNA in lineare Fragmente auftreten (Wang, 1974), sollten sich bei der Transkription lediglich in einer generellen Verminderung der Initiationsraten äußern, jedoch keinen Einfluß auf die Erkennung von Promotoren durch RNA Polymerasen ausüben (Stüber und Bujard, 1979; Botchan, 1976).
Kleine DNA-Fragmente als Matrize bieten den Vorteil, daß sie in den meisten Fällen eine artifizielle Termination der Transkription an den Enden der Fragmente ("run off-transcripts") erzwingen und somit in der Regel zu einer eng begrenzten Anzahl vergleichsweise kurzer, definierter RNA-Produkte führen (Ernst, 1978; vgl. auch Cech und McClure, 1980).

Die genaue Kenntnis der ØX174-Promotoren (vgl. Sanger *et al.*, 1977) erlaubt nun gezielt die Frage, inwieweit auch die RNA Polymerase aus *M.luteus* diese zu erkennen und dort die Synthese von RNA zu initiieren vermag. Als Matrize zur RNA-Synthese wurden Restriktionsfragmente gewählt, von denen angenommen werden konnte, daß sie zum einen den gesamten zur RNA-Initiation notwendigen Sequenzbereich (Schaller *et al.*, 1975) und zum andern eine für die RNA-Produktanalyse ausreichend lange transkribierbare Region enthalten.
Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob es weitere DNA-Sequenzabschnitte gibt, die nur für eine der beiden RNA-Polymerasen als Promotoren oder Terminatoren fungieren und worauf gegebenenfalls die spezifische Wirkung solcher Signalsequenzen beruhen könnte.

Material und Methoden

Material

1. RNA Polymerase-Präparationen

RNA Polymerase Holoenzym und Coreenzym sowie σ-Untereinheit aus E.coli wurden von Frl. Dr. Ch. Leib und Frau S. Klüpfel-Stahl zur Verfügung gestellt.

Konzentrationen:

Holoenzym: 6.5 mg/ml Protein (Molgewicht 438000 = 0.44 µg/pmol)

Coreenzym: 8.9 mg/ml Protein (Molgewicht 368000 = 0.37 µg/pmol)

σ-Untereinheit: ca. 0.8 mg/ml (Molgewicht 70000 = 0.07 µg/pmol)

(Die Molgewichte wurden von Berg et al.(1971) und von R.R. Burgess (pers. Mitteilung) übernommen.)

RNA Polymerase Holoenzym aus M.luteus wurde von Frau S. Klüpfel-Stahl nach einer Vorschrift von Lill et al. (1977) angereichert.

Konzentration: 2.2 mg/ml Protein (Molgewicht 430000 = 0.43 µg/pmol)

M.luteus σ-Untereinheit wurde von Frau S. Klüpfel-Stahl isoliert wie von Lill et al. (1977) beschrieben. Isoliertes σ zeigte keine Eigenaktivität.

Konzentration: ca. 0.25 mg/ml Protein (Molgewicht 65000 = 0.065 µg/pmol)

(Die Molgewichte wurden von Lill et al. (1977) und G.R. Hartmann (unveröffentlicht) übernommen.)

Die Reinheit der Enzympräparationen wurde durch Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese überprüft (vgl. Lill et al., 1977; Leib, 1979).

Alle Enzyme und Untereinheiten wurden in Lagerungspuffer (10 mmol Tris-HCl/l, pH 7.9; 0.1 mmol EDTA/l; 0.1 mol KCl/l; 0.1 mmol Dithioerythritol/l; 60 % (v/v) Glycerin) bei -20°C aufbewahrt.

Für den Transkriptionsansatz wurden die Enzyme mit 10 mmol Tris-HCl/l, pH 7.9; 0.1 mmol Dithioerythritol/l auf die geeignete Konzentration verdünnt.

2. Nukleinsäuren

Bakteriophagen øX174 RF I DNA: New England Biolabs, Beverly, USA

Die DNA wurde isoliert aus E.coli nach Infektion mit øX174 am3 cs70 (sequenziert von Sanger et al., 1977). Die DNA-Präparationen enthielten nach Angaben des Herstellers zu mehr als 95 % RF I DNA.
Molgewicht: 3.5×10^6 (5386 Basenpaare (Sanger et al. 1978)
DNA-Konzentration: 600 - 800 µg/ml (je nach Präparation)

Col E1 DNA wurde isoliert wie bei Ernst (1978) beschrieben.

Transfer-RNA (aus Bierhefe), 5 S ribosomale RNA, aminosäurespezifische Transfer-RNAs: Boehringer Mannheim
$tRNA^{Val}$ aus Escherichia coli MRE 600
$tRNA^{Tyr}$ aus E.coli MRE 600
5 S rRNA aus E.coli MRE 600

Na-Nukleinat aus Hefe: Boehringer Mannheim

3. Desoxyribonukleasen

3.1. DNase I (aus Rinderpankreas, RNase-frei): Worthington Biochem. Corp. New Jersey, USA

3.2. Restriktionsendonukleasen

Hae III, HincII, Taq I, Mbo II, Fnu4H-I: New England Biolabs, Beverly, USA

Alu I: Boehringer, Mannheim

Hae III: Restriktionsendonuklease aus Haemophilus aegyptius

Erkennungssequenz 5'-GG▼CC-3'
3'-CC▲GG-5'

HincII: Restriktionsendonuklease aus Haemophilus influencae Rc

Erkennungssequenz 5'-GTPyPuA▼C-3'
3'-CAPuPyT▲G-5'
(isoschizomer mit HindII)

Taq I: Restriktionsendonuklease aus Thermus aquaticus YT I

Erkennungssequenz 5'-T▼CGA-3'
3'-AGC▲T-5'

Mbo II: Restriktionsendonuklease aus Moraxella bovis

Erkennungssequenz 5'-GAAGANNNNNNNN▼-3'
3'-CTTCTNNNNNNN▲-5'

Fnu4H-I: Restriktionsendonuklease aus Fusobacterium nucleatum 4H

Erkennungssequenz 5'-GC▼NGC-3'
3'-CGNC▲G-5'
(N = beliebige Base)

Alu I: Restriktionsendonuklease aus Arthrobacter luteus

Erkennungssequenz 5'-AG▼CT-3'
3'-TC▲GA-5'

Alle Restriktionsenzyme wurden bei -20°C aufbewahrt.

4. Ribonukleasen

Ribonuklease T_1 aus Aspergillus oryzae: Sankyo Co.,Ltd.,Tokyo; Boehringer, Mannheim

Ribonuklease U_2 aus Ustilago sphaerogena: Sankyo Co.,Ltd., Tokyo

Nuklease aus Staphylococcus aureus: Worthington

Endonuklease aus Neurospora crassa: Boehringer, Mannheim

RNase A: Boehringer, Mannheim

5. Nukleotide

Ribonukleosid-5'-triphosphate: Boehringer, Mannheim

Dinukleosidmonophosphate: Sigma Chemie, München

Dinukleotide und Nukleosidtriphosphate wurden in H_2O gelöst (Dinukleotide: 2.5 mmol/l; Nukleosidtriphosphate: 7.5 mmol/l (ATP, GTP, CTP, UTP) bzw. 2.0 mmol/l (UTP)) und mit 1 mol NaOH/l auf pH 7.0 eingestellt.

[α-^{32}P]UTP, [γ-^{32}P]GTP : Amersham Buchler, Braunschweig

[α-^{32}P]UTP (400 Ci/mmol) wurde zur Trockne einrotiert und mit H_2O auf eine Konzentration von 1 mCi/ml eingestellt. [γ-^{32}P]GTP (10 - 30 Ci/mmol) wurde nach Einrotieren zur Trockne auf 25 mCi/ml eingestellt.

6. Chromatographiematerialien

Sephadex G50 (fine): Pharmacia, Uppsala, Schweden

Hydroxyapatit (DNA Grade, HTP): Bio-Rad Laboratories, Richmond,USA

Whatman 3MM-Chromatographiepapier: Hormuth und Vetter, Wiesloch, Baden

Polygram CEL 300 DEAE/HR-2/15 -Platten (20 x 40 cm): Macherey und Nagel, Düren

7. Materialien für Elektrophoresen

Agarose (low EEO): Sigma Chemie, München

Acrylamid (reinst), N,N'-Methylenbisacrylamid, N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TMED), Natriumdodecylsulfat (SDS): Serva, Heidelberg
Dimethylaminopropionitril: Merck-Schuchardt, München
Celluloseacetat-Streifen (3 x 55 cm): Schleicher u. Schüll GmbH, Dassel

8. Membranfilter

Cellulosenitrat-Membranfilter (45 µ, Größe 25): Sartorius, Göttingen
Cellulosenitrat-Membranfilter BA 85: Schleicher u. Schüll GmbH, Dassel

9. Färbematerialien und Filme

Kieselgel-Fertigplatten für Dünnschichtchromatographie (20 x 20 cm) mit Fluoreszenzindikator : Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid: Sigma Chemie, München
Röntgenfilm Kodak RP Royal X-Omat (Entwickler Kodak D-19 developer powder): Kodak
Polaroidfilm Typ 107: Photo Schaja, München

10. Sonstige Chemikalien

Ethylendiamintetraessigsäure, Dinatriumsalz (EDTA), Ammoniumperoxodisulfat, Bromphenolblau, Harnstoff (für biochemische Zwecke), Saccharose, Glycerin, Na-citrat: Merck, Darmstadt
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris): Fluka, Eschborn
Polyvinylpyrrolidon, 1,4-Dithioerythritol, Rinderserumalbumin: Sigma Chemie, München
Silikonlösung, Glaskugeln (silikonisiert), Glaswatte (silanisiert): Serva, Heidelberg
Xylen-Cyanol: Serva, Heidelberg

Rifampicin war ein Geschenk der Gruppo Lepetit, Mailand, Italien.

11. Geräte

Mikro-Dialysekammer (50 µl): E. Schütt Jun., Göttingen
Gebrauchsanleitung s. in "Molecular Biology, Biochemistry and Biophysics. Micromethods in Molecular Biology", V. Neuhoff ed., Springer-Verlag Berlin - Heidelberg - New York (1973) pp. 395 - 398.

UV-Spektrometer: Zeiß-Spektralphotometer M4QIII/PMQII

Szintillationsspektrometer: Searle Analytic, Modell 6892

Fraktionssammler: LKB UltroRac 7000

Lyophilisator: Christ, Beta

Methoden

1. Gelelektrophoresen

Plattengelelektrophoresen wurden gewöhnlich in einer Apparatur der Firma Hölzel (Dorfen, Obb) durchgeführt.

1.1. Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung und zur Isolierung von DNA-Restriktionsfragmenten wurden Agarose-Plattengele (150 x 120 x 3 mm) mit einem Agarosegehalt von 1.2 - 1.4 % (w/v) verwendet. Dazu wurde die entsprechende Menge Agarose durch 30 minutiges Kochen in 50 ml TEP-Puffer pH 7.7 (siehe unten) gelöst, nach Abkühlen auf 45°C mit 5 µl Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) versetzt und auf ein vorher angefertigtes 0.5 cm hohes Stützgel mit 5 % Acrylamidgehalt (vgl. Abschnitt 1.2.), das ein Rutschen des Agarosegels während der Elektrophorese verhindert, gegossen.

TEP-Puffer pH 7.7: 0.036 mol Tris/l, 0.03 mol NaH_2PO_4/l, 0.01 mol EDTA/l, mit NaOH auf pH 7.7 eingestellt (bei 25°C).

Elektrophorese: 4 - 5 h bei 90 V/40 mA (Raumtemperatur)

Elektrophoresepuffer: TEP-Puffer pH 7.7 mit 1 µg/ml Ethidiumbromid

DNA-Fragmente mit einer Länge von 300 - 400 Basenpaaren wandern bei der Elektrophorese mit dem Farbstoff Bromphenolblau.

1.2. 2.5 % Acrylamid- 0.5 % Agarose-Gele

Die Analyse von DNA-Fragmenten in einem Längenbereich zwischen 200 und 1500 Basenpaaren und von RNAs mit über

250 Nukleotiden Länge erfolgte in niederprozentigen Polyacrylamidgelen. Plattengele mit einem Acrylamidgehalt von weniger als 3 % benötigen zur Stabilisierung einen Anteil von 0.5 - 0.6 % Agarose (Peacock und Dingman, 1968).
Bei der hier benutzten Gelapparatur war es nötig, zunächst ein höherprozentiges Stützgel und auf dieses das eigentliche Trenngel zu gießen.

Stützgel:

Die Gellösung enthielt in 10 ml:

2.5 ml 20 % (w/v) Acrylamid (Acrylamid:N,N'-Methylenbisacrylamid = 19:1)
1.0 ml 10fach konzentrierter TEP-Puffer pH 7.7 (vgl. Abschnitt 1.1.)
0.5 ml 2.0 % (w/v) SDS
0.1 ml Ammoniumperoxodisulfat (30 mg/ml)
0.02 ml N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TMED)

Trenngel:

Zur Herstellung des Trenngels wurden 200 mg Agarose durch 10 minutiges Erhitzen auf 90°C in 16 ml 2fach konzentriertem TEP-Puffer pH 7.7 und 12.25 ml 0.5 % (w/v) SDS gelöst. Nach Abkühlen der klaren Lösung auf 45°C wurden 10.5 ml einer Lösung A (auf 45°C erwärmt) zugesetzt und die Polymerisation mit 1.5 ml Ammoniumperoxodisulfat (16 mg/ml) gestartet.

Lösung A: 7 ml TEP-Puffer pH 7.7 (vgl. Abschnitt 1.1.)
4 ml 6.4 % (v/v) Dimethylaminopropionitril
10 ml 20 % (w/v) Acrylamid (Acrylamid:N,N'-Methylenbisacrylamid = 19:1)

Elektrophorese: 30 min 50 V, 4 - 5 h 100 V (Raumtemperatur)
Elektrodenpuffer: TEP-Puffer pH 7.7

Nach der Elektrophorese wurden die Gele mit Ethidiumbromid (1 µg/ml) angefärbt bzw. eine Autoradiographie angefertigt.

1.3. Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur Auftrennung von RNA unter denaturierenden Bedingungen

Die Trennung der *in vitro* synthetisierten RNA-Spezies in einem Längenbereich bis zu 250 Nukleotiden erfolgte, wenn nicht in den Legenden zu den Figuren anders beschrieben, in 8 %igen denaturierenden Polyacrylamidgelen (150 x 120 x 1.5 mm).

50 ml Gellösung enthielten:

- 3.8 g Acrylamid
- 0.2 g N,N'-Methylenbisacrylamid
- 21 g Harnstoff
- 5 ml 10fach konzentrierter TEP-Puffer pH 7.7
- 2.5 ml 2.0 % (w/v) SDS
- 0.5 ml Ammoniumperoxodisulfat (30 mg/ml)
- 0.1 ml N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin

Die Gele ließ man über Nacht in feuchter Atmosphäre durchpolymerisieren.
Elektrophorese: 30 min 60 V, 4 - 5 h 100 V (Raumtemperatur)
Elektrodenpuffer: TEP-Puffer pH 7.7 (vgl. Abschnitt 1.1.)

Zur Sichtbarmachung der RNA-Längenstandards wurden die Gele auf eine Kieselgel-Dünnschichtplatte mit Fluoreszenzindikator (vgl. Material) gelegt und unter kurzwelligem UV-Licht die RNA-Banden vermessen.

1.4. Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur Sequenzierung γ-^{32}P-markierter RNA

Zur Ermittlung der Nukleotidsequenz γ-^{32}P-markierter RNAs mit Hilfe der von Donis-Keller *et al.* (1977) und Simoncsits *et al.* (1977) entwickelten Methode der Sequenzanalyse auf

Polyacrylamidgelen wurde mit Gelen (430 x 350 x 0.35 mm) folgender Zusammensetzung gearbeitet (Domdey, 1979):

100 ml Gellösung enthielten:

19.3 g Acrylamid
0.7 g N,N'-Methylenbisacrylamid
42.0 g Harnstoff
10 ml 0.5 mol Tris-Borat/l - 10 mmol EDTA/l (pH 8.3)
17 µl N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TMED)
67 µl Ammoniumperoxodisulfat (50 %ig (w/v))

Zur vollständigen Polymerisation wurden die Gele über Nacht in feuchter Atmosphäre stehen gelassen.

Elektrophorese: Vorelektrophorese für 1 h bei 500 V und Raumtemperatur; nach dem Auftragen der Proben wurde die Elektrophorese mit 300 V gestartet und nach 1 h die Spannung auf 1000 V erhöht.

Elektrodenpuffer: 50 mmol Tris-Borat/l, 1 mmol EDTA/l, pH 8.3

Die Wanderungsgeschwindigkeit der Farbstoffe Xylen-Cyanol und Bromphenolblau entspricht dabei der von RNA-Fragmenten mit ca. 26 bzw. 7 - 8 Nukleotiden Länge.

Bei allen Gelen zur Auftrennung radioaktiver Produkte wurde nach der Elektrophorese eine der beiden Glasplatten, zwischen denen sich das Gel befindet, entfernt, das Gel kurz mit H_2O gespült, mit Haushaltsfolie bedeckt und anschließend eine Autoradiographie angefertigt.

2. DNA-Abbau mit Restriktionsenzymen

Die Spaltung von φX174 RF I DNA mit Restriktionsendonukleasen erfolgte in 6 mmol NaCl/l, 6 mmol Tris-HCl/l (pH 7.4), 6 mmol $MgCl_2$/l, 1.0 mmol Dithioerythritol/l, 200 µg Rinderserumalbumin/ml. Im Falle der Enzyme HincII und Alu I wurde die Konzentration an NaCl auf 50 mmol/l erhöht. Mit Ausnahme von Taq I (Inkubationstemperatur: 65°C) wurde der DNA-Abbau 3 h bei 37°C durchgeführt. In allen Fällen wurde mit Enzym-Überschuß gearbeitet (2 - 3 Einheiten Enzym/µg DNA; eine Einheit ist definiert als die Menge, die erforderlich ist, um 1.0 µg Lambda DNA in 15 min bei 37°C (Taq I: 65°C) in einem Gesamtvolumen von 50 µl vollständig zu spalten).

3. Isolierung von Restriktionsfragmenten

φX174-Restriktionsfragmente wurden in Anlehnung an eine Methode von Ledeboer et al. (1978) isoliert und gereinigt. Das durch Spaltung mit einem Restriktionsenzym erzeugte DNA-Fragmentgemisch wurde in einem 1.4 %igen Agarose-Gel (vgl. Abschnitt 1.1.) aufgetrennt, wobei als Puffer im Gel wie als Elektrophoresepuffer 40 mmol Tris-acetat/l (pH 7.7), 20 mmol Na-acetat/l und 1.0 mmol EDTA/l verwendet wurde. Zur Anfärbung der DNA-Banden enthielt der Puffer 1 µg/ml Ethidiumbromid. Die den zu isolierenden DNA-Fragmenten entsprechenden Banden wurden mit einer Rasierklinge ausgeschnitten und die Gelstücke gemäß der von Ledeboer et al. (1978) gezeigten Anordnung auf trockenes Hydroxylapatit gelegt; den Aufbau bedeckte man mit Haushaltsfolie und ließ die DNA in das Hydroxylapatit einwandern (ca. 8 h). Im Unterschied zu den zitierten Autoren wurde zum DNA-Transfer ein Puffer mit 40 mmol Tris-acetat/l (pH 7.7), 20 mmol Na-acetat/l, 0.1 mmol EDTA/l verwendet.

Das Hydroxylapatit wurde dann auf eine ca. 7 cm hohe Sephadex G50-Säule (Pasteurpipette; Glaswolle und Glaskugeln silikonisiert; Sephadex G50 (fine) in DNA-Transfer-Puffer 24 h vorgequollen) aufgetragen und das DNA-Fragment mit möglichst wenig 0.6 mol Na-phosphat/l (pH 7.4) aus dem Hydroxylapatit eluiert (der Vorgang kann unter langwelligem UV-Licht anhand der Ethidiumbromidfluoreszenz verfolgt werden). Die weitere Elution erfolgte mit DNA-Transfer-Puffer. Die DNA-haltigen Fraktionen (in Eppendorf-Gefäßen oder silikonisierten Glasgefäßen) wurden durch Lyophilisieren auf ein Volumen von ca. 50 µl eingeengt und in einer Mikrodialysekammer (vgl. Material) 24 h bei $4^{\circ}C$ gegen 50 mmol Tris-HCl/l (pH 7.9), 6 mmol NaCl/l dialysiert.
Die Ausbeute an DNA-Fragment bei diesem Verfahren betrug ca. 60 %.

4. In vitro-RNA-Synthese

Der in vitro-Transkriptionsansatz (Standard-System) enthielt in einem Gesamtvolumen von 0.125 ml:

12.5 µl	0.5 mol Tris-HCl/l (pH 7.9)
5 µl	2.5 mmol Dithioerythritol/l
12.5 µl	0.1 mol $MgCl_2$/l
12.5 µl	2.0 mol KCl/l
10 µl	7.5 mmol ATP/l
10 µl	7.5 mmol GTP/l
10 µl	7.5 mmol CTP/l
10 µl	2.0 mmol UTP/l
10 µCi	[α-^{32}P]UTP (400 Ci/mmol)
1.6 pmol	DNA-Fragment
6.5 pmol	RNA Polymerase

Daraus ergeben sich folgende Endkonzentrationen für die

einzelnen Komponenten: 50 mmol Tris-HCl/l (pH 7.9), 0.1 mmol Dithioerythritol/l, 10 mmol $MgCl_2$/l, 200 mmol KCl/l, je 0.6 mmol Nukleotid/l an ATP, GTP, CTP, 0.16 mmol UTP/l sowie 12.8 nmol DNA-Fragment/l und 52.0 nmol RNA-Polymerase/l.
Die Komponenten wurden bei 0°C zusammenpipettiert und die RNA-Synthese durch Erhöhung der Temperatur auf 37°C gestartet. Nach 30-minutiger Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion durch Zusatz von 125 µl EDTA/tRNA-Lösung (50 mmol EDTA/l + 200 µg/ml tRNA) in Eis gestoppt.
Die synthetisierte RNA wurde durch Zugabe von 0.5 ml Ethanol von -20°C und Kühlung auf -60°C ausgefällt und 10 min in einer Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert. Der getrocknete Niederschlag wurde in 25 µl Spaltpuffer (7 mol Harnstoff/l, 0.1 % (w/v) SDS, 0.1 % (w/v) Bromphenolblau, 20 % (w/v) Sucrose in TEP-Puffer pH 7.7 (vgl. Abschnitt 1.1.)) aufgenommen, 2 min auf 95°C erhitzt, im Eisbad abgekühlt und zur Elektrophorese auf ein denaturierendes Polyacrylamidgel (vgl. Abschnitt 1.3.) aufgetragen.

5. RNA-DNA-Hybridisierung

Der Transfer von DNA-Restriktionsfragmenten aus einem Agarosegel auf Cellulosenitrat-Filter wurde ähnlich durchgeführt wie von Southern (1975) beschrieben.

5 µg eines øX174-Restriktionsfragment-Gemisches wurden in einem 1.2 %igen Agarosegel aufgetrennt und der die DNA-Banden enthaltende Gelstreifen ausgeschnitten. Zur Denaturierung der DNA wurde der Gelstreifen 20 min in 1.5 mol NaCl/l, 0.5 mol NaOH/l gelegt und anschließend 25 min in 3 mol NaCl/l, 0.5 mol Tris-HCl/l (pH 7.2) neutralisiert.

Das Gel wurde 10 min mit 6 x SSC (SSC: 0.15 mol NaCl/l, 0.015 mol Na-citrat/l) gewaschen und mit einem Streifen

Cellulosenitrat-Filter bedeckt, der mit 2 x SSC getränkt war. Der DNA-Transfer aus dem Gel in den Filterstreifen (ca. 10 h) erfolgte mit 6 x SSC in der von Southern (1975) abgebildeten Anordnung. Nach Waschen mit 2 x SSC ließ man den Cellulosenitratstreifen im Exsikkator trocknen und hielt ihn unter Vakuum 2 h bei 80°C. Die beladenen Filter wurden im Exsikkator aufbewahrt.

Die Reinigung der zur Hybridisierung verwendeten RNA erfolgte wie von Gabain und Bujard (1977) beschrieben:
Der Transkriptionsansatz war identisch mit dem in Abschnitt 4. angeführten Standardsystem, mit Ausnahme der eingesetzten Mengen an RNA Polymerase (hier: 12 pmol) und DNA-Fragmentgemisch (hier: 3 pmol je Fragment).
Nach 50-minutiger Inkubation bei 37°C wurden 2 µg DNase I zugegeben und die Inkubation 10 min bei 25°C fortgesetzt. Anschließend wurde die Lösung zweimal mit je 250 µl Phenol (gesättigt mit 0.5 mol Tris-HCl/l (pH 7.9), 0.1 mol NaCl/l, 1 mmol EDTA/l) versetzt, geschüttelt und zentrifugiert (15 min, Eppendorf-Tischzentrifuge). Restliches Phenol in der Probe wurde mit 200 µl Ether extrahiert.
Durch Gelfiltration der Proben in einer Sephadex G50-Säule (14 x 1 cm; Elution mit 0.1 mol NaCl/l) wurde der größte Teil nicht umgesetzten radioaktiven Substrats entfernt, wobei RNA-haltige Fraktionen durch aufsteigende Papierchromatographie (Johnston und McClure, 1976) ermittelt wurden. Diese Fraktionen wurden vereinigt, gefriergetrocknet, der Rückstand in 1 ml 0.03 mol Na-citrat/l und 0.2 ml 6 x SSC aufgenommen und die Lösung zur Hybridisierung eingesetzt.

Zur Hybridisierung wurden die mit DNA beladenen Cellulosenitratfilter zunächst bei 65°C 4 h in ca. 150 ml Denhart's Lösung (6 x SSC, 0.02 % (w/v) Rinderserumalbumin, 0.02 % (w/v) Ficoll, 0.02 % (w/v) Polyvinylpyrrolidon) (Denhart, 1966) inkubiert. Die Hybridisierung selbst erfolgte in einem Plexiglasgefäß (im Hohlraum zwischen zwei konzen-

trischen Zylindern) in 1.2 ml RNA-Lösung 20 h bei 65°C. Anschließend wurde der Filterstreifen nach zweimaligem Waschen in je 100 ml 4 x SSC (30 min, 65°C) mit hitzebehandelter RNase A (40 µg/ml) in 2 x SSC 50 min bei 25°C inkubiert, dann mit 2 x SSC in Gegenwart von ca. 10 mmol UTP/l gespült und an der Luft getrocknet. Das im Filter gebundene radioaktive Material wurde durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

6. Filterbindung von RNA Polymerase-DNA-Komplexen

Die Bildung von Komplexen aus RNA Polymerase und øX174-Restriktionsfragmenten wurde nach einer Vorschrift von Jones *et al.* (1977) mit einigen von Spiegelman und Whiteley (1978) beschriebenen Modifikationen untersucht.

DNA-Enzym-Komplexe wurden in 0.25 ml eines Puffers aus 50 mmol Tris-HCl/l (pH 7.9), 0.01 mol $MgCl_2$/l, 0.1 mmol Dithioerythritol/l, 0.1 mmol EDTA/l, 0.2 mol KCl/l bei 37°C in Gegenwart von jeweils 40 mmol/l ATP, GTP und UTP gebildet.
Es wurden 35 µg *E.coli* RNA Polymerase bzw. 34 µg *M.luteus* Polymerase und 5 µg øX174-Restriktionsfragmentgemisch eingesetzt, was ein molares Enzym : DNA-Verhältnis von 50 : 1 ergibt.
Nach 20-minutiger Inkubation wurden 200 µg Heparin zugesetzt und weitere 10 min bei 37°C inkubiert. Anschliessend wurden die Proben bei 0°C mit je 2.0 ml einer Lösung aus 50 mmol Tris-HCl/l (pH 7.9), 10 mmol $MgCl_2$/l, 0.2 mg/ml Rinderserumalbumin und 1.0 mol NaCl/l verdünnt und unter schwachem Vakuum durch Cellulosenitrat-Filter (Sartorius 0.45 µ) filtriert. Mit 2.0 ml kaltem Verdünnungspuffer (50 mmol Tris-HCl/l (pH 7.9), 10 mmol $MgCl_2$/l,

0.2 mg/ml Rinderserumalbumin) von 0°C und mit 1.5 ml Verdünnungspuffer von 25°C wurden die Filter gewaschen.

Die am Filter gebundene DNA wurde durch 10-minutige Inkubation bei 55°C in 0.5 ml 1 mmol Tris-HCl/l (pH 7.9), 1 mmol $MgCl_2$/l und 0.1 % (w/v) SDS vom Filter gelöst, die Lösung bis zur Trockne lyophilisiert und in 30 µl Elektrophoresepuffer (vgl. Abschnitt 1.2.) mit 10 % (w/v) Sucrose aufgenommen.

Die DNA-Fragmente wurden in einem 2.5 %igen Polyacrylamidgel mit 0.5 % Agarose (vgl. Abschnitt 1.2.) aufgetrennt und mit Ethidiumbromid (1 µg/ml) angefärbt.

7. RNA-Sequenzanalyse

7.1. Spezifische Initiation mit Dinukleotiden

Der Transkriptionsansatz zur spezifischen Initiation mit Dinukleotiden enthielt in einem Gesamtvolumen von 0.125 ml 6.5 pmol RNA Polymerase, 1.6 pmol DNA-Restriktionsfragment, 50 mmol Tris-HCl/l (pH 7.9), 10 mmol $MgCl_2$/l, 0.2 mol KCl/l, 0.1 mmol DTE/l, 10 µCi [α-^{32}P]UTP (400 Ci/mmol), 0.2 mmol Dinukleotid/l, 10 µmol GTP/l und je 25 µmol/l ATP, CTP und UTP. Die Versuchsdurchführung erfolgte analog zu Minkley und Pribnow (1973) wie in Abschnitt D.5.2. des Ergebnisteils beschrieben. Die Proben wurden wie in Abschnitt 4. behandelt und die Transkripte auf einem denaturierenden 8 %igen Polyacrylamid-Gel (vgl. Abschnitt 1.3.) analysiert.

7.2. Synthese und Isolierung γ-^{32}P-markierter RNA

Die Synthese 5'-markierter RNA wurde in 4 parallelen Ansätzen mit einem jeweiligen Gesamtvolumen von 100 µl durchgeführt. Jeder Ansatz enthielt neben den übrigen Komponenten des Standard-Transkriptionsansatzes (vgl. Abschnitt 4.) an Stelle von 0.6 mmol GTP/l 250 µCi [γ-^{32}P]GTP (25 Ci/mmol) in einer Konzentration von 0.1 mmol GTP/l und statt radioaktiv markiertem UTP unmarkiertes UTP in einer Konzentration von 0.4 mmol UTP/l. Gegenüber dem Standard-Ansatz wurde die Menge an DNA-Fragment auf 3.2 pmol und an RNA Polymerase auf 13 pmol erhöht. Die Inkubationsdauer bei 37°C betrug 90 min. Nach Beendigung der Reaktion wurde die RNA mit dem doppelten Volumen Ethanol gefällt, 10 min zentrifugiert (Eppendorf-Tischzentrifuge) und der Niederschlag in 25 µl Spaltpuffer (8 mol Harnstoff/l, 0.5 % (w/v) SDS, 10 % (v/v) Glycerin, 0.1 % (w/v) Bromphenolblau in TEB-Puffer pH 8.3 (siehe unten) durch 2 min Erhitzen auf 90°C gelöst. Die Auftrennung der RNAs erfolgte in einem 8 %igen Polyacrylamidgel (vgl. Abschnitt 1.3.) in Gegenwart von 7 mol Harnstoff/l. Als Puffer im Gel sowie als Elektrophoresepuffer wurde TEB-Puffer pH 8.3 verwendet.

TEB-Puffer: 50 mmol Tris/l, 2 mmol EDTA/l, 50 mmol Borsäure/l; die Lösung besitzt einen pH-Wert von 8.3.

Elektrophorese: 15 min 60 V, ca. 5 h 120 V (Raumtemp.)

Das radioaktiv markierte GTP wandert mit dem Bromphenolblau; die Elektrophorese wurde daher erst beendet, wenn der Farbstoff vollständig aus dem Gel gelaufen war.

Die radioaktiven RNA-Produkte wurden durch Autoradiographie im Gel lokalisiert, die Bande der zu sequenzierenden RNA-Spezies aus dem Gel ausgeschnitten und durch Messung der Čerenkov-Strahlung die Radioaktivität im Gel bestimmt.

Die Elution der RNA aus dem Gel erfolgte mit einer Lösung aus 0.5 mol Ammoniumacetat/l, 10 mmol Mg-acetat/l, 0.2 % (w/v) SDS, 0.1 mmol EDTA/l (Maxam und Gilbert, 1977). Dazu wurden die Gelstücke in einem Eppendorf-Gefäß bei -70°C eingefroren und mit einem Glasstab zerrieben; dann wurden 0.3 ml Elutionslösung und nicht mehr als insgesamt 0.8 OD_{260} tRNA zugesetzt und durch mehrmaliges Einfrieren und Zerreiben des Gels die RNA eluiert. Die Effizienz der Elution wurde verfolgt durch Zentrifugation (15 min, Eppendorf-Tischzentrifuge) und Vergleich der Radioaktivität in Überstand und zerkleinerter Gelmasse.

Nach abschließender Zentrifugation (15 min, Eppendorf-Tischzentrifuge) und Filtration des Überstandes durch silikonisierte Glaswolle wurde die RNA mit dem doppelten Volumen Ethanol bei -60°C gefällt und zur Sequenzierung in 10 µl H_2O aufgenommen.

7.3. Ermittlung der 5'-terminalen Nukleotide durch zweidimensionale Auftrennung von Oligonukleotiden ("mobility shift"-Methode)

Die Sequenzanalyse in vitro synthetisierter RNA wurde von Herrn Dr. H. Domdey am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried bei München, durchgeführt.

Spaltet man 5'-endmarkierte RNA partiell mit einer unspezifischen Endonuklease oder durch saure Hydrolyse, so entstehen unter geeigneten Reaktionsbedingungen Oligonukleotide aller möglichen Kettenlängen. Durch zweidimensionale Auftrennung dieser Oligonukleotide mittels Hochspannungselektrophorese auf Celluloseacetat (1.Dimension) und Homochromatographie auf DEAE-Cellulose (2.Dimension) kann

anhand der relativen Mobilitäten von Oligonukleotiden, die sich in der Länge um jeweils ein Nukleotid unterscheiden, die Nukleotidsequenz des RNA-5'-Endes bis zu ca. 15 Nukleotiden abgelesen werden.

Die Hochspannungselektrophorese auf Celluloseacetat erfolgte nach dem von Sanger et al. (1965) geschilderten Verfahren.
Dazu wurde γ-^{32}P-markierte, isolierte RNA (Abschnitt 7.2.) durch Gelelektrophorese in einem hochprozentigen Polyacrylamidgel (vgl. Abschnitt 1.4.) und Elution aus dem Gel nachgereinigt.
Ca. 2×10^4 Ipm der markierten RNA wurden mit 0.1 OD_{260} tRNA versetzt und bis zur Trockne evakuiert. Die Partialspaltung der RNA erfolgte durch Zugabe von 5 µl einer Mischung aus 70 µl 9 mol Harnstoff/l, 30 µl 1 N H_2SO_4, 3 µl einer Farbstofflösung (1 % (w/v) Xylen-Cyanol/Bromphenolblau) und 2-minutige Inkubation bei 100°C. Durch Einfrieren in Trockeneis wurde die Reaktion gestoppt.
Die Probe wurde sofort nach dem Auftauen mit einer Konstriktionspipette auf einen Celluloseacetat-Streifen (30 x 550 mm) aufgetragen, der mit 5 % (v/v) Essigsäure-Pyridin, 1 mmol EDTA/l, 7 mol Harnstoff/l pH 3.5 befeuchtet war. Die Elektrophorese erfolgte in einem Hochspannungselektrophoresegerät der Firma Savant Instruments Inc., Hicksville, New York (Modell HVE 8036).

Elektrophorese: 1 h, 5000 V

Elektrodenpuffer: 5 % (v/v) Eisessig, 0.5 % (v/v) Pyridin, 1 mmol EDTA/l, pH 3.5

Zur Auftrennung in der zweiten Dimension wurden die Oligonukleotide nach der von Sanger et al. (1965) beschriebenen Methode auf eine DEAE-Cellulose-Dünnschichtplatte übertragen.
Die Auftrennung der RNA-Fragmente auf DEAE-Cellulose ge-

schah durch Homochromatographie. Dabei handelt es sich um eine Verdrängungschromatographie, wozu als Laufmittel ein RNA-Hydrolysat in 7 mol Harnstoff/l verwendet wird. Das RNA-Hydrolysat wird durch kontrollierte alkalische Hydrolyse von RNA mit KOH erzeugt; durch die KOH-Menge kann die Kettenlänge der Oligonukleotide variiert werden.

Die Homochromatographielösung wurde durch 20-stündige Hydrolyse von 3 % Na-Nukleinat aus Hefe bei 65°C mit 50 mmol KOH/l in 7 mol Harnstoff/l hergestellt. Zur Stabilisierung wurde die Lösung mittels Eisessig auf pH 4.7 eingestellt (Jay et al., 1974).

Nach Beendigung der Chromatographie wurde eine Autoradiographie angefertigt (Expositionszeit ca. 5 Wochen).

Auswertung der zweidimensionalen Oligonukleotid-Auftrennung:

Das Autoradiogramm der 5'-markierten Oligonukleotide (Fig. 30.) wurde von Dr. H. Domdey ausgewertet wie bei Domdey (1980) beschrieben.

Die Wanderung der Oligonukleotide bei der Hochspannungselektrophorese auf Celluloseacetat hängt im Wesentlichen von der Nukleotidzusammensetzung ab, während die Homochromatographie an DEAE-Cellulose nach Kettenlänge auftrennt; dabei kann aus dem Abstand zwischen zwei Abbauprodukten in Laufrichtung der Chromatographie auf die Abspaltung eines Purins (großer Abstand) oder Pyrimidins (kleiner Abstand) geschlossen werden.
Ein allgemeines Schema, das die relativen Mobilitäten von Deoxynukleotiden beschreibt (Tu und Wu, 1980), ist auch für Oligoribonukleotide gültig (Fig. 2.).

Aus der Differenz der Laufstrecken eines Oligonukleotids n und des um ein Nukleotid verlängerten Oligonukleotids n + Nu (Nu = A,G,C,U) und den Winkeln zwischen den Verbindungslinien in Laufrichtung der Chromatographie aufeinan-

derfolgender Oligonukleotide läßt sich direkt die Nukleotidsequenz ablesen.

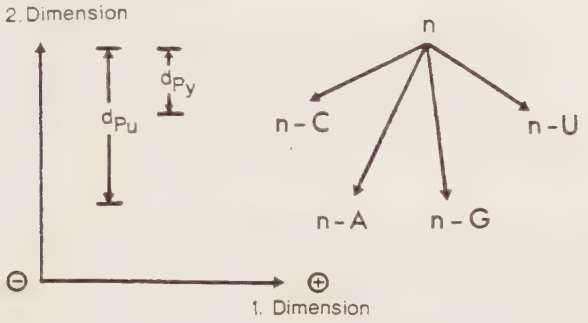


Fig. 2. (nach Tu und Wu (1980))

d_{Pu} = Laufstreckendifferenz bei Addition eines Purinnukleotids

d_{Py} = Laufstreckendifferenz bei Addition eines Pyrimidinnukleotids

Ist das 5'-Ende der RNA, wie in der vorliegenden Arbeit, mit [γ-^{32}P]GTP markiert, führt die hohe Ladung der Triphosphatgruppe zu einer gegenüber einem Guanosinmonophosphat schnelleren Wanderung des endständigen GTP und damit zu einem vom obigen Schema abweichenden Winkel der Verbindungslinie zum darauffolgenden Dinukleotid pppGpU (vgl. Fig. 30.).

7.4. RNA-Sequenzanalyse durch spezifische enzymatische Partialspaltung und Polyacrylamidgelelektrophorese

Mit Hilfe der von Donis-Keller *et al.* (1977) und von Simoncsits *et al.* (1977) entwickelten Methode zur raschen Sequenzierung langkettiger Oligonukleotide kann die Sequenz einer 5'-markierten RNA etwa ab Nukleotid 10 direkt abgelesen werden.

Die kontrollierte Spaltung γ-^{32}P-markierter RNA (Abschnitt 7.2.) mittels basenspezifischer RNasen und die Auftrennung der Spaltprodukte wurden ebenfalls von Herrn Dr. H. Domdey vorgenommen. Mit einigen geringen Abweichungen wurde unter den von Krupp und Gross(1979) angegebenen Reaktionsbedingungen gearbeitet (vgl. Fig. 31.):

Die auf 7 Eppendorf-Gefäße aufgeteilte und getrocknete 5'-^{32}P-markierte RNA (ca. 0.1 OD_{260}; ca. 50000 Ipm) wurde mit je 4 µl der unten angegebenen jeweiligen Reaktionsmischung versetzt, 5 min bei 50°C vorinkubiert und in Eis gestellt. Dann wurde 1 µl Enzym (siehe unten) zugegeben und 15 min bei 50°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Einfrieren in Trockeneis gestoppt und die Proben wurden nach Auftauen auf ein Sequenzgel aufgetragen (vgl. Abschnitt 1.4.).

Reaktionsmischungen:

Alle Mischungen enthielten 180 µl 9 mol Harnstoff/l und 6 µl Farbstoff-Gemisch (1 % (w/v) Xylen-Cyanol/Bromphenolblau).
Zusätzlich waren in den einzelnen Reaktionsmischungen zugegen:
Bedingungen: -Enzym; +RNase T_1; +RNase U_2:
4 µl 1 mol Na-citrat/l pH 3.5
2 µl 0.1 mol EDTA/l
8 µl H_2O

+S_3 (Nuklease aus Staphylococcus aureus; Reaktion bei pH 3.5) :

4 µl 1 mol Na-citrat/l, pH 3.5
10 µl H_2O

+S_7 (Nuklease aus S.aureus; Reaktion bei pH 7.5) :

4 µl 1 mol Tris-HCl/l, pH 7.5
4 µl 0.5 mol $CaCl_2$/l
6 µl H_2O

+N (Nuklease aus Neurospora crassa) :

4 µl 1 mol Tris-HCl/l, pH 7.5
10 µl H_2O

Zur kontrollierten sauren Hydrolyse (Spalte H^+ in Fig. 31.) wurde die markierte RNA in 5 µl 0.01 N H_2SO_4 1 min auf 100°C erhitzt.

Eingesetzte Enzymmengen und Spaltungsspezifitäten der Nukleasen:

1 µl RNase T_1: 0.005 Einheiten; das Enzym spaltet spezifisch nach Guanosin.

1 µl RNase U_2: 0.04 Einheiten; das Enzym spaltet spezifisch nach Adenosin.

1 µl S_3: 30 Einheiten; Staphylococcus aureus Nuklease spaltet unter den angegebenen Bedingungen bei pH 3.5 nach Pyrimidinen, besonders effizient in Polypyrimidin-Abschnitten.

1 µl S_7: 3 Einheiten; S.aureus Nuklease spaltet bei pH 7.5 in Gegenwart von 10 mmol $CaCl_2$/l vor U oder A (in 5'- 3'-Richtung gelesen).

1 µl N: 1 µg (kann variieren je nach Aktivität der verwendeten Präparation);

Neurospora crassa Nuklease spaltet in Gegenwart von 7 mol Harnstoff/l bei pH 7.5 alle Phosphodiesterbindungen mit Ausnahme von Cytidin-Nu-Bindungen (Nu = beliebiges Nukleotid). Dabei werden 5'-^{32}P-markierte Oligonukleotide ohne Phosphatgruppen an den 3'-Enden, im Gegensatz zu den anderen hier angeführten RNasen, erzeugt, was zu einer etwas geringeren Mobilität im Gel führt (Aufwärtsverschiebung der N.crassa-Leiter um ca. ein Nukleotid).

8. Autoradiographie und Auswertung von Gelen

Radioaktive Substanzen wurden durch Autoradiographie an einem Röntgenfilm Kodak RP Royal X-Omat (RP/R-54) sichtbar gemacht. Die Expositionszeit betrug je nach Radioaktivität zwischen 3 h und 6 Wochen. Sequenzgele mit längerer Expositionszeit wurden bei -20°C gehalten, um Diffusion der Banden zu vermeiden.
Die Autoradiogramme wurden zum Teil densitometrisch mit einem Mikrodensitometer 3CS (Joyce-Loebl) aufgezeichnet (vgl. dazu auch Ernst (1978)).

Ergebnisse

A. Vergleichende Transkription von DNA-Fragmenten, die Promotoren der E.coli RNA Polymerase enthalten, durch die RNA Polymerase aus M.luteus

1. Fragmente mit dem øX174 Gen A-Promotor

1.1. Fragment HindII/4

Bei der Spaltung von øX174 RF DNA mit dem Restriktionsenzym HindII wird ein Fragment (HindII/4 (3700/4194)[1]) erzeugt, das den Startpunkt der Gen A mRNA enthält (Fig. 1. und 3.).

Inkubiert man dieses isolierte DNA-Fragment mit RNA Polymerase aus M.luteus im in vitro-Transkriptionssystem (vgl. Methoden, Abschnitt 4.) bei einer Salzkonzentration von 0.2 mol KCl/l und trennt die entstandenen RNA-Produkte in einem Polyacrylamidgel auf, erkennt man mehrere schwache Banden; eine von diesen (A) verdient besonderes Interesse: Führt man dasselbe Experiment mit RNA Polymerase aus E.coli durch so wird präferentiell eine RNA-Spezies mit gleicher Mobilität in der Elektrophorese erzeugt (Fig. 4.).

---

[1]) Die angegebenen Zahlen bedeuten die Positionen der ersten und der letzten Base des jeweiligen Restriktionsfragments auf dem Phagengenom. Die Numerierung erfolgte entsprechend Sanger et al. (1977) und bezieht sich auf die einzige Pst I -Schnittstelle auf der DNA als Nullpunkt.

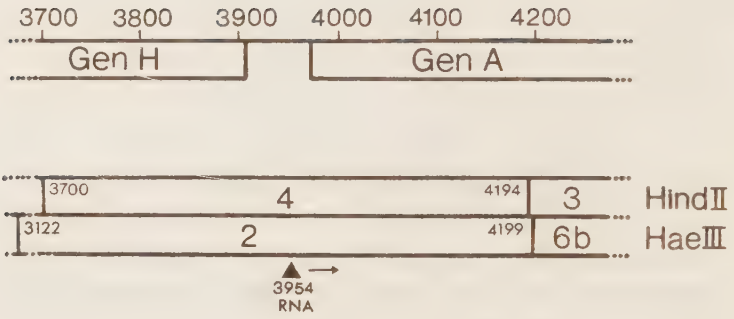


Fig. 3. Spaltstellen der Restriktionsenzyme HindII und Hae III auf øX174 RF DNA im Bereich des Gen A Promotors

Lokalisierung des mRNA-Startpunkts und Numerierung der Basen erfolgten nach Sanger et al. (1977). Die Zählung der Basen bezieht sich auf die einzige Pst I -Schnittstelle auf dem Genom als Nullpunkt.

Eine Längenbestimmung mittels 5S rRNA (120 Nukleotide) und einer spezifischen tRNA ($tRNA^{val}$: 75 Nukleotide) als Marker in der Elektrophorese ergibt für dieses Transkript A eine Länge von ungefähr 250 Nukleotiden, wenn man eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus der RNA-Längen und den Laufstrecken der RNAs im Gel voraussetzt.

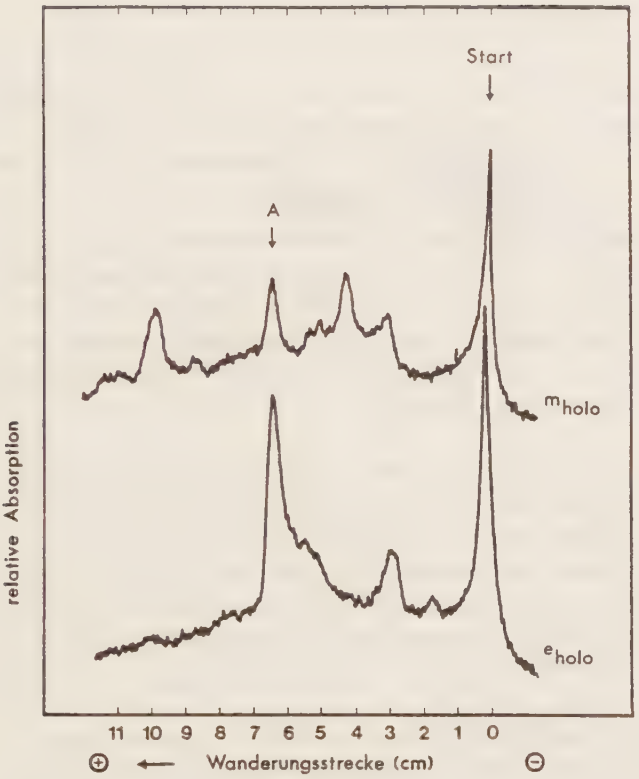


Fig. 4. Analyse der in vitro-Transkripte von øX174-Restriktionsfragment HindII/4 (3700/4194)

^{m}holo: RNA-Synthese mit RNA Polymerase Holoenzym aus M.luteus

^{e}holo: RNA-Synthese mit RNA Polymerase Holoenzym aus E.coli

Die RNA-Synthese wurde durchgeführt wie im Methodenteil (Abschnitt 4.) beschrieben (Standardsystem). Die RNAs wurden in einem 5 % Polyacrylamid-Gel mit 7 mol Harnstoff/l und 0.1 % (w/v) SDS aufgetrennt (vgl. Methoden, Abschnitt 1.3.). Nach Autoradiographie wurde der Röntgenfilm densitometrisch ausgewertet (Abbildungsverhältnis 1:1).

A: Spezifisches Transkript des DNA-Fragments HindII/4

1.2. Fragment Hae III/2

Das Fragment 2, das beim Abbau von øX174 RF DNA mit dem Restriktionsenzym Hae III entsteht, trägt ebenso wie HindII/4 (3700/4194) die Gen A mRNA-Startstelle, ist aber um 583 Basenpaare länger als dieses (Fig. 1. und 3.).

Bei der Transkription des isolierten Fragments Hae III/2 (3122/4199)[1)] durch M.luteus und E.coli Polymerase erhält man ein Transkriptmuster, das hinsichtlich der Länge wie der relativen Menge der synthetisierten RNA-Spezies dem jeweiligen an Fragment HindII/4 (3700/4194) abgelesenen sehr ähnlich ist (Fig. 5.).

Dieses Resultat wird verständlich, wenn man eine Termination der Transkription an den rechten Enden der Fragmente HindII/4 (3700/4194) und Hae III/2 (3122/4199), die auf dem øX174-Genom nur wenige Nukleotide voneinander entfernt sind, annimmt. Daraus ergibt sich, daß die Initiation der Synthese des Transkripts A im Bereich des Gen A Promotors stattfindet.

Es ist somit ersichtlich, daß auch die Polymerase aus M.luteus den øX174 Gen A-Promotor erkennt und dort RNA-Synthese, allerdings bei gleichen Enzymkonzentrationen in einem deutlich geringeren Ausmaß wie E.coli RNA Polymerase, startet.

2. Untersuchung eines Fragments mit dem øX174 Gen B - Promotor

Bei der Analyse von øX174 in vitro-Transkripten fanden Smith und Sinsheimer (1976) übereinstimmend mit N. Axelrod (1976b) einen hohen Grad an Hybridisierung mit dem

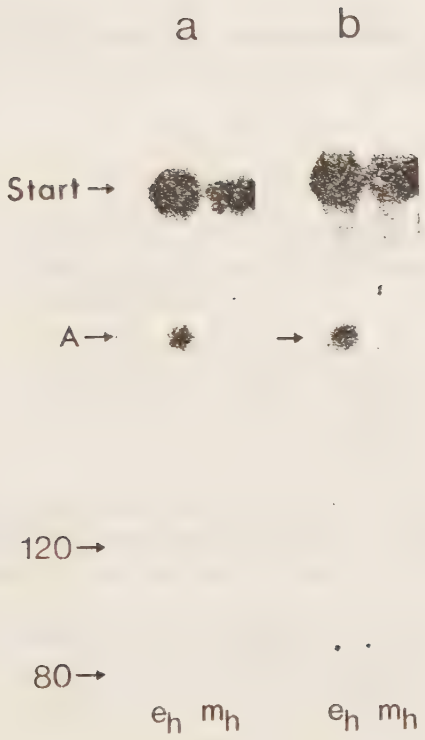


Fig. 5. Vergleich der Transkriptmuster bei Verwendung der øX174 Restriktionsfragmente HindII/4 und Hae III/2 als Matrize

a: Transkription von Fragment HindII/4 (3700/4194)

b: Transkription von Fragment Hae III/2 (3122/4199)

e_h: RNA-Synthese mit RNA Polymerase Holoenzym aus E.coli

m_h: RNA-Synthese mit RNA Polymerase Holoenzym aus M.luteus

Transkriptionsbedingungen und Gelelektrophorese s. unter Methoden (Abschnitte 1.3. und 4.). Die Laufstrecken der verwendeten RNA-Längenstandards (75 bzw. 120 Nukleotide) wurden unter UV-Licht mit Hilfe eines Fluoreszenzindikators ermittelt (vgl. Methoden 1.3.).

A: Spezifische Transkripte der Restriktionsfragmente

Fragment 8 einer HindII-Spaltung von øX174 RF DNA. Das DNA-Fragment hat eine Länge von 210 Basenpaaren und ist auf dem Phagengenom unmittelbar vor dem Gen B lokalisiert (Fig. 6.).

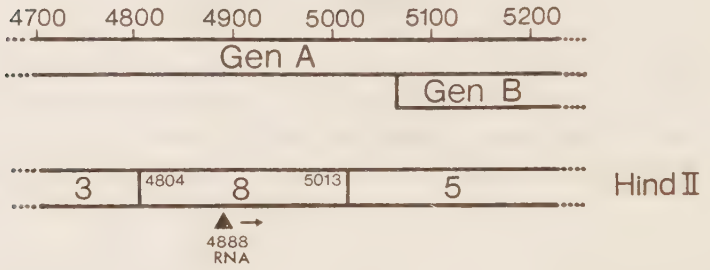


Fig. 6. Spaltstellen des Restriktionsenzyms HindII auf øX174 RF DNA im Bereich des Gen B Promotors

Die Positionen des DNA-Fragments HindII/8 (4804/5013) und der Startstelle der Gen B mRNA (Pfeil) wurden aus Sanger et al. (1977) übernommen.

Die Transkription des isolierten Fragments HindII/8 (4804/5013) durch M.luteus RNA Polymerase liefert neben radioaktiven Produkten heterogener Länge eine diskrete RNA-Spezies mit einer Länge von ca. 120 Nukleotiden (Fig. 7.). Unter der Annahme eines Abbruchs der RNA-Synthese am rechten Ende des DNA-Fragments läßt sich der Start des Transkriptes B in einem Bereich lokalisieren, der von J. E. Sims und D. Dressler (vgl. Sanger et al. (1977): Note added in proof) als Gen B -Promotor angegeben wird.
Daß es sich hier tatsächlich um die Erkennung des B-Promotors durch M.luteus Polymerase handelt, unterstreicht der Befund, daß die Polymerase aus E.coli an HindII/8 (4804/5013)

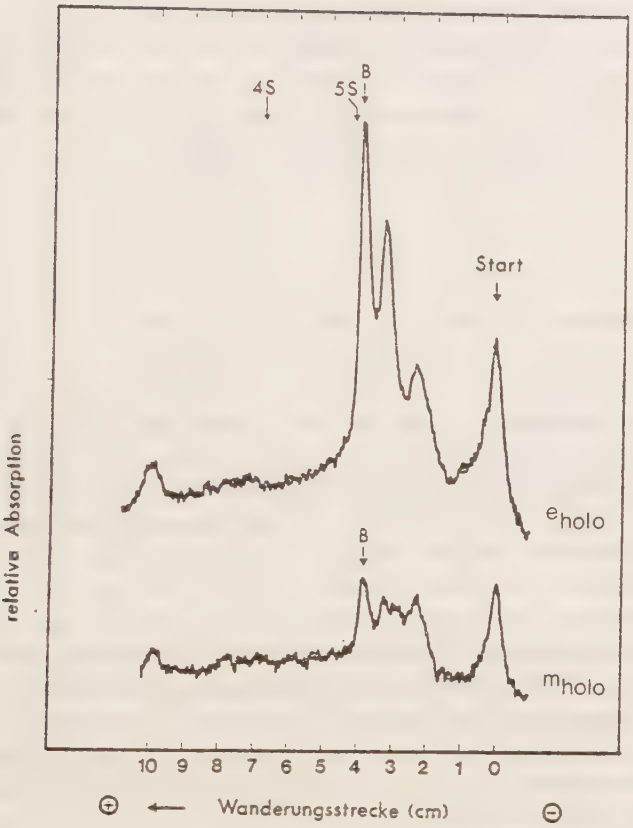


Fig. 7. Analyse der in vitro-Transkripte von øX174-Restriktionsfragment HindII/8

^{e}holo: RNA-Synthese mit RNA Polymerase aus E.coli

^{m}holo: RNA-Synthese mit RNA Polymerase aus M.luteus

Zur Versuchsdurchführung vgl. Methoden, Abschnitt 4. und Legende zu Fig. 5. Die radiaktiv markierten RNA-Banden wurden nach Autoradiographie densitometrisch aufgezeichnet.

B: Spezifisches Transkript des Restriktionsfragments HindII/8

als Matrize bevorzugt eine RNA gleicher Länge wie das M.luteus-Enzym abliest (Fig. 7.).
Wie aus den relativen Intensitäten der entsprechenden RNA-Banden weiter hervorgeht, beträgt hier unter identischen Bedingungen die RNA-Syntheserate durch E.coli Polymerase etwa das fünffache der des M.luteus-Enzyms.

3. Fragmente mit dem øX174 Gen D - Promotor

Die Promotorregion, in der die Gen D mRNA von øX174 initiiert wird, erscheint in einer Hinsicht besonders interessant: Da für das mit dem Gen D überlappende Gen E (Barrell et al., 1976), welches für ein Lysisprotein des Phagen kodiert (Hutchison und Sinsheimer, 1966), kein separater Promotor nachgewiesen werden konnte, muß die Nukleotidsequenz einer einzigen mRNA, deren Synthese der Kontrolle des Gen D-Promotors unterliegt, in gegeneinander verschobenen Ableserastern für mehrere unabhängige Genprodukte kodieren. Ein auf der Ebene der Transkription bestehender Regulationsmechanismus könnte sich nun möglicherweise in der Transkriptionsaktivität einer RNA Polymerase aus einem fremden Organismus bemerkbar machen.

3.1. Fragment Taq I/4

Zur Untersuchung der obigen Frage sollte sich ein durch das Restriktionsenzym Taq I erzeugtes Fragment Taq I/4 (164/490) eignen; dieses Fragment enthält die Gen D mRNA-Startstelle (Position 358) und sollte im Falle einer RNA-Synthese von dort bis zum rechten Fragmentende ein Transkript von 133 Nukleotiden Länge liefern (Fig. 8.).

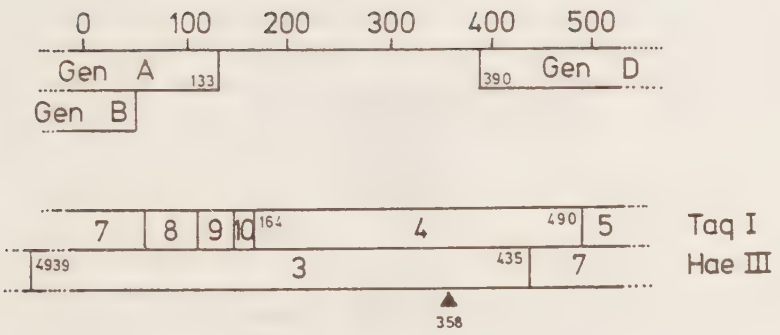


Fig. 8. Spaltstellen der Restriktionsenzyme Taq I und Hae III auf øX174 RF DNA im Bereich des Gen D - Promotors

Die Numerierung der Basen an den Schnittstellen der Enzyme und der Startstelle der Gen D mRNA (Pfeil) entspricht der von Sanger et al. (1977).

Bei der Transkription des isolierten Fragments Taq I/4 (164/490) durch E.coli RNA Polymerase entsteht in der Tat eine RNA-Spezies (^{T}D), deren Länge etwa 140 Nukleotide beträgt (Fig. 9.).
Da sich die Abweichung von der erwarteten Transkriptlänge innerhalb der der Methode anhaftenden Fehlergrenze bewegt, scheint es wahrscheinlich, daß die Synthese dieser RNA am Gen D - Promotor beginnt. Von den weiteren RNA-Produkten könnte die längste RNA-Spezies ein "end to end"-Transkript darstellen; möglicherweise handelt es sich aber um Artefakte, die durch die Elektrophorese verursacht werden.

Untersucht man nun die Ablesung von Taq I/4 (164/490) durch M.luteus RNA Polymerase, so findet man hier eine RNA, die in der Länge mit dem von E.coli Polymerase erzeugten Transkript ^{T}D übereinstimmt (Fig. 9.).

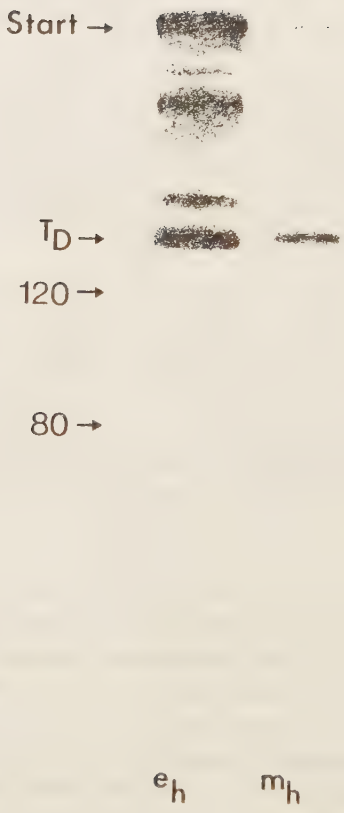


Fig. 9. Analyse der *in vitro*-Transkripte von øX174-Restriktionsfragment *Taq* I/4

Zur Versuchsdurchführung siehe Methoden (Abschnitt 4.) und Legende zu Fig. 5.

e_h: RNA-Synthese mit RNA Polymerase aus *E.coli*
m_h: RNA-Synthese mit RNA Polymerase aus *M.luteus*
T_D: Spezifisches Transkript des Restriktionsfragments *Taq* I/4

Ein Vergleich der unter der Kontrolle des Gen D-Promotors durch die beiden Enzymspezies synthetisierten RNA-Mengen anhand der Autoradiographie ergibt hier, daß unter identischen Reaktionsbedingungen mit E.coli Polymerase etwa dreimal soviel an Promotor D - spezifischer RNA gebildet wird wie mit dem M.luteus-Enzym.

3.2. Fragment Hae III/3

Um die mit Fragment Taq I/4 (164/490) als Matrize erhaltenen Aussagen zu untermauern und gleichzeitig auszuschließen, daß dieses Fragment für beide Polymerase-Spezies zur RNA-Synthese wichtige Sequenzbereiche nicht enthält, wurde ein weiteres, erheblich längeres Fragment, das bei der Spaltung von øX174 RF DNA mit dem Restriktionsenzym Hae III entsteht, auf seine Eigenschaft als Matrize untersucht. Das Fragment Hae III/3 (4939/435) enthält ebenso wie Taq I/4 (164/490) die Startstelle der Gen D mRNA, reicht aber am linken Ende um 601 Basenpaare über das Taq I-Fragment hinaus (Fig. 8.). Ein an der beschriebenen Gen D RNA-Startstelle initiiertes Transkript müßte im Falle einer Termination am rechten Fragmentende eine Länge von 78 Nukleotiden aufweisen.

Bei der Ablesung von Fragment Hae III/3 (4939/435) durch die RNA Polymerasen aus M.luteus und E.coli wird in der Tat von beiden Enzymen ein klar definiertes RNA-Produkt ^{H}D mit einer Länge von ca. 80 Nukleotiden synthetisiert (Fig. 10.).

Sowohl die Länge der RNA ^{H}D als auch das Verhältnis der Bandenintensitäten - es läßt sich auch hier eine etwa vier- bis fünffach höhere Syntheserate durch E.coli Polymerase abschätzen - sprechen dafür, daß die an den Fragmenten Taq I/4 (164/490) und Hae III/3 (4939/435) abgelesenen RNA-Spezies ^{T}D bzw. ^{H}D an der gleichen Stelle, dem Gen D - Promotor, initiiert werden.
Gleichzeitig kann aus diesem Ergebnis gefolgert werden, daß DNA-Sequenzen, die mehr als 195 Basenpaare vor der RNA-

Fig. 10. Analyse der in vitro-Transkripte von øX174-Restriktionsfragment Hae III/3

e_h: RNA-Synthese mit RNA Polymerase aus E.coli

m_h: RNA-Synthese mit RNA Polymerase aus M.luteus

Die Versuchsdurchführung erfolgte wie in Methoden (Abschnitt 4.) und in Legende zu Fig. 5. beschrieben.

H_D: Spezifisches Transkript des Restriktionsfragments Hae III/3

Initiationsstelle liegen, für die Initiation und deren Regulation keine entscheidende Rolle spielen.

Die in den vorangegangenen Abschnitten beschriebenen Untersuchungen zeigen klar, daß die RNA Polymerase aus M.luteus ebenso wie das E.coli-Enzym in der Lage ist, mit Hilfe von Restriktionsenzymen isolierte Promotoren des E.coli-Phagen øX174 zu erkennen und an diesen die Synthese spezifischer RNA zu initiieren.

Bemerkenswert ist die Übereinstimmung in den relativen Syntheseraten sämtlicher promotorspezifischer Transkripte, wenn man die beiden verschiedenen Polymerase-Spezies miteinander vergleicht. In allen Fällen wird mit E.coli Polymerase etwa die drei- bis fünffache Menge an promotorspezifisch erzeugter RNA gegenüber dem M.luteus-Enzym gefunden.
An dieser Stelle muß jedoch auf die Problematik, mit der eine solche Aussage verbunden ist, besonders hingewiesen werden. Bei der Auftrennung der im Transkriptionsansatz produzierten RNA in Polyacrylamidgelen wird häufig - insbesondere im Falle der E.coli Polymerase - beobachtet, daß ein vergleichsweise hoher Anteil an radioaktivem Material selbst nach Erhitzen in 7 mol Harnstoff/l und bei Anwesenheit von Harnstoff im Gel nicht in das Gel einwandert. Dieser Anteil verringert sich bei Gelen mit niedriger Acrylamidkonzentration oder nach Behandlung der Proben mit Phenol. Dabei zeigen sich in keinem Fall qualitative Veränderungen des jeweiligen RNA-Produktmusters. Für quantitative Aussagen kann dieser Effekt jedoch eine nicht vernachlässigbare Fehlerquelle bedeuten.
Eine weitere, gewichtigere Einschränkung eines Vergleichs von Syntheseraten verschiedener RNA Polymerasen folgt aus einem Befund von Chamberlin et al. (1979), wonach der Gehalt an aktiven Enzymen in RNA Polymerase-Proben aus verschiedenen Anreicherungen in einem Bereich von 20 bis 90 %

variieren kann. Da jedoch bei den hier beschriebenen Experimenten stets unter Polymerase-Überschuß gearbeitet wurde und die transkribierten DNA-Fragmente nur eine eng begrenzte Anzahl an Promotoren enthalten, sollte die Qualität der RNA Polymerase-Präparationen beim Vergleich der RNA-Syntheseraten kaum ins Gewicht fallen.

B. Analyse von Transkripten durch Hybridisierung an Restriktionsfragmente

Eine schnelle, qualitative Zuordnung von RNA zu komplementären DNA-Regionen kann mit einer Methode der Hybridisierung an Restriktionsfragmente erreicht werden, die von E. M. Southern (1975) entwickelt wurde.

Zur Untersuchung von Speziesspezifitäten in der Ablesung durch E.coli- bzw. M.luteus-RNA Polymerase mit Hilfe dieser Methode wurde von folgender Überlegung ausgegangen:
Inkubiert man ein Gemisch von Restriktionsfragmenten im in vitro-Transkriptionssystem, so sollten die dabei entstehenden Transkripte nur mit den DNA-Fragmenten hybridisieren, die den jeweiligen Promotor und einen zur Hybridisierung ausreichend langen transkribierten Abschnitt enthalten.
Damit müßte es möglich sein, gegebenenfalls Promotoren, die im wesentlichen nur von einer der beiden betrachteten Polymerasen erkannt werden, nachzuweisen.

1. Transkripte von HindII-Fragmenten

Der Abbau von øX174 RF DNA mit dem Restriktionsenzym HindII liefert 13 Fragmente in einem Größenbereich zwischen 1048 und 78 Basenpaaren (Lee und Sinsheimer, 1974; Sanger et al., 1977).
Transkribiert man dieses HindII-Fragmentgemisch in Gegenwart von α-^{32}P-markiertem UTP parallel mit den RNA Polymerasen aus E.coli und M.luteus und läßt die jeweils synthetisierte RNA bei 68°C mit denselben direkt von einem Agarose-Gel (Fig. 11.a) in einem "blotting"-Verfahren auf ein Cellulosenitratfilter übertragenen denaturierten DNA-Fragmenten hybridisieren (vgl. Methoden, Abschnitt 5.), so erhält man nach Autoradiographie folgendes Ergebnis (Fig. 11.b):

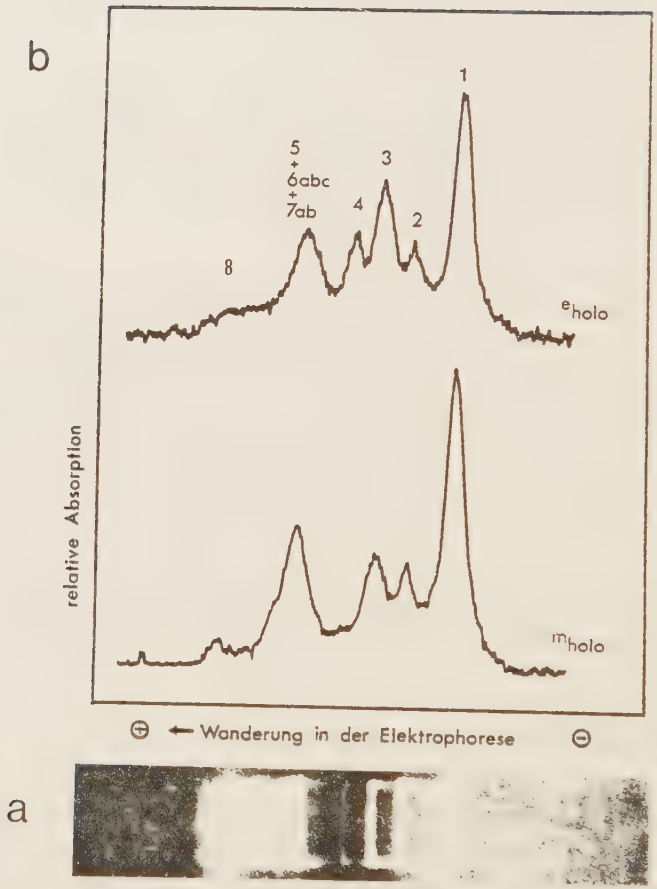


Fig. 11. Hybridisierung von in vitro-Transkripten an øX174 HindII-Restriktionsfragmente nach Transkription eines HindII-Fragmentgemisches von øX174 RF DNA

a: Spaltmuster der HindII-Fragmente nach Auftrennung in einem 1.2 % Agarose-Gel und Anfärbung mit Ethidiumbromid (vgl. Methoden, Abschn. 1.1. und 2.).

Für beide Polymerase-Spezies übereinstimmend sind Präferenzen in der Hybridisierung ihrer RNA-Produkte mit den HindII-Fragmenten 1, 3 und der Summe der nicht mehr aufgelösten Fragmente 5, 6abc und 7ab festzustellen. Ebenfalls gemeinsam ist eine deutlich geringere Menge mit den Fragmenten 2 und 8 hybridisierter RNA.
Ein Unterschied zwischen den Enzym-Spezies wird hingegen im Falle des Fragments 4 beobachtet: Einer klar erkennbaren Menge an Hybrid aus diesem Fragment und den Transkripten der E.coli Polymerase steht eine nur andeutungsweise erkennbare Hybridbildung auf Seiten der M.luteus Polymerase gegenüber.

Diese Befunde sind insgesamt betrachtet einigermaßen überraschend. In der unterschiedlichen Hybridisierung an Fragment 4, das den A-Promotor enthält, drückt sich offenbar die bereits bei der Transkription des isolierten Fragments gefundene Präferenz des E.coli-Enzyms in der Initiation an diesem Promotor aus (vgl. Abschnitt A.1.1.); diesen Effekt würde man jedoch ebenso an Fragment 8 - dieses enthält wie erwähnt den Gen B-Promotor - und möglicherweise an Fragment 6c, das die Startstelle der Gen D mRNA trägt (Fig. 1.), erwarten.
Erstaunlich ist auch der hohe Grad an Hybridbildung bei den Fragmenten 1 und 3, auf denen in vitro keine signifikante Promotoraktivität nachgewiesen werden konnte (Smith und Sinsheimer, 1976).

---

b: Hybridisierungsmuster der am HindII-Fragmentgemisch abgelesenen Transkripte

Die DNA-Fragmente wurden aus dem Agarosegel (vgl. Fig. 11.a) auf Cellulosenitratfilter übertragen wie in Abschnitt 5. des Methodenteils beschrieben. An die denaturierten, filtergebundenen DNA-Fragmente wurde α-^{32}P-markierte (ca. 8 x 10^5 Ipm), durch Transkription des øX174 HindII-Fragmentgemisches erzeugte RNA hybridisiert (vgl. Methoden, Abschn. 4. und 5.).
Die RNA-DNA-Hybride wurden durch Autoradiographie sichtbar gemacht und die Banden densitometrisch aufgezeichnet.

^{e}holo: RNA-Synthese mit RNA Polymerase aus E.coli

^{m}holo: RNA-Synthese mit RNA Polymerase aus M.luteus

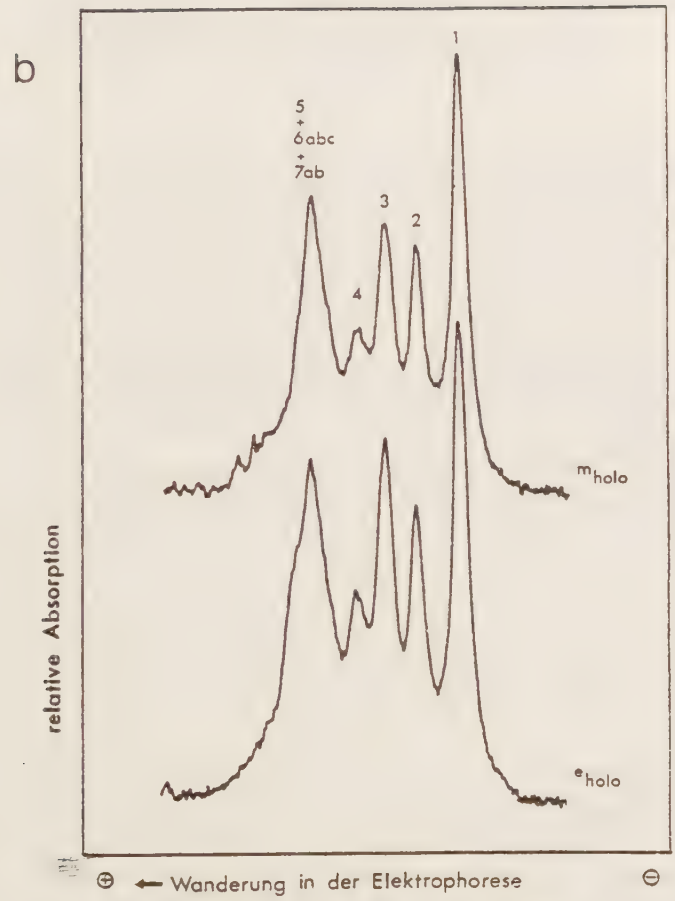
2. Transkripte der linearisierten øX174 RF DNA

In der Absicht, eventuell Unterschiede zwischen den RNA-Polymerasen in der Termination der Transkription zu finden, wurde das geschilderte Experiment dahingehend modifiziert, daß man zur Hybridisierung radioaktiv markierte RNA verwendete, die an der mit dem Restriktionsenzym Pst I linearisierten øX174 RF DNA (Brown und Smith, 1976) abgelesen wird.
Dabei zeigt sich fast dasselbe Bild wie im vorangegangenen Versuch (Fig. 12.). Der einzige wesentliche Unterschied dazu liegt in einer verstärkten Hybridisierung der von M.luteus Polymerase synthetisierten RNA mit Fragment 4, sodaß die Hybridisierungsmuster für beide Polymerase-Spezies praktisch identisch sind.

Wie lassen sich diese Beobachtungen erklären?

Artefakte als Folge der experimentellen Bedingungen können ausgeschlossen werden, da es unter denselben Bedingungen nicht möglich war, eine Hybridbildung aus filtergebundener linearisierter ColE1 DNA (Tomizawa et al., 1974) und in vitro synthetisierter øX174 mRNA nachzuweisen (ohne Beleg).

Hingegen ist es gut vorstellbar, daß die Existenz homologer Sequenzbereiche auf øX174 DNA zur Hybridisierung von RNA mit nichttranskribierten DNA-Regionen führt. Diese Interpretation würde auch in Einklang stehen mit dem von N. Axelrod (1976b) beschriebenen Phänomen einer "allgemeinen Hybridisierung" bei der Analyse von øX174 in vitro-Transkripten.
Tatsächlich konnten kürzlich Edlind und Ihler (1980) durch Kombination von elektronenmikroskopischer Analyse und DNA-Sequenzvergleich einen hohen Grad an Basenpaarung zwischen weit entfernten DNA-Bereichen auf einzelsträngiger viraler øX174 DNA nachweisen.


b
1
5
+
6abc
+
7ab
3
2
4
mholo
eholo
relative Absorption
⊕ ← Wanderung in der Elektrophorese ⊖

a

Fig. 12. Hybridisierung von *in vitro*-Transkripten an øX174 HindII-Fragmente nach Transkription linearisierter øX174 RF DNA

a: øX174 HindII-Fragmente, aufgetrennt in einem 1.2 % Agarose-Gel (vgl. Methoden, Abschnitt 1.1.)

b: Hybridisierungsmuster der an linearisierter øX174 RF DNA (Restriktionsenzym Pst I) abgelesenen Transkripte

Versuchsdurchführung vgl. Methoden, Abschnitte 4. und 5. Mit Ausnahme der Verwendung von linearisierter øX174 RF DNA an Stelle der HindII-Fragmente als Matrize zur Transkription wurde verfahren wie in Legende zu Fig. 11. beschrieben.

^{e}holo: RNA-Synthese mit RNA Polymerase aus *E.coli*

^{m}holo: RNA-Synthese mit RNA Polymerase aus *M.luteus*

C. Untersuchungen der RNA Polymerase-DNA-Wechselwirkung durch Bindung an Restriktionsfragmente

Im vorausgegangenen Abschnitt war versucht worden, eventuelle Unterschiede in der Enzym-DNA-Wechselwirkung zwischen den RNA Polymerasen aus E.coli und M.luteus anhand der jeweils synthetisierten RNA-Produkte aufzudecken. Diese indirekte Methode ist jedoch, wie gezeigt, zumindest an øX174 DNA mit erheblichen Problemen verbunden.

Ein einfacher, direkter Nachweis von Spezifitäten in der Polymerase-DNA-Interaktion sollte nun mit einer Methode möglich sein, die erstmals von Jones und Berg (1966) beschrieben wurde, der sogenannten Filterbindungs-Technik. Man macht dabei von der Tatsache Gebrauch, daß Cellulosenitrat DNA-Fragmente bindet, die einen stabilen Komplex mit einem Protein bilden, während nichtkomplexierte doppelsträngige DNA nicht gebunden wird.
Diese Methode wurde in zahlreichen Fällen zu RNA Polymerase-DNA-Bindungsstudien benutzt (Jones et al., 1977; Talkington und Pero, 1978; Gabain und Bujard, 1979; Spiegelman und Whiteley, 1979).

Inkubiert man ein Gemisch von Restriktionsfragmenten 10 min bei 37°C und einer Salzkonzentration von 0.2 mol KCl/l mit RNA Polymerase in Gegenwart von nur 3 Triphosphaten (ATP, GTP, UTP) als Substrat, so können sich sehr stabile ternäre Initiationskomplexe aus Promotor-DNA, Enzym und der naszierenden RNA-Kette ausbilden. Durch Zusatz eines Überschusses an Heparin wird freie und unspezifisch oder labil gebundene RNA Polymerase inaktiviert (Zillig et al., 1970). Bei der Filtration dieses Gemisches durch ein Cellulosenitratfilter werden nur solche DNA-Fragmente im Filter zurückgehalten, die im Salz- und Heparin-stabilen ternären Komplex gebunden sind. Anschließend werden die Fragmente mit einem Detergens (0.1 % SDS) vom Filter gelöst, elek-

trophoretisch im Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch Anfärbung mit dem Farbstoff Ethidiumbromid sichtbar gemacht.

1. Bindung an øX174 HindII-Fragmente

Ein Filterbindungs-Experiment mit den DNA-Fragmenten aus einer Spaltung von øX174 RF DNA durch das Restriktionsenzym HindII und den RNA Polymerasen aus E.coli und M.luteus läßt deutlich Unterschiede zwischen den beiden Enzym-Spezies in der Bindung an bestimmte DNA-Fragmente erkennen (Fig. 13.).
Besonders hervorzuheben ist die präferentielle Bindung von M.luteus Polymerase an das HindII-Fragment 1 und an eines oder mehrere der Fragmente 6a, 6b und 6c, die wegen ihrer nur wenig verschiedenen Längen im Gel nicht mehr aufgelöst sind.
Im Falle der E.coli Polymerase, deren Spezifität in der Bindung an die HindII-Fragmente weniger ausgeprägt erscheint, fällt ein gegenüber M.luteus Polymerase erhöhtes Maß an Komplexbildung mit Fragment 4 auf.

In der Bindung des E.coli-Enzyms an Fragment HindII/4 (3700/4194) spiegelt sich offensichtlich die sowohl durch RNA-DNA-Hybridisierung (vgl. Abschnitt B.1.) als auch durch direkte Transkription des isolierten Fragments (vgl. Abschnitt A. 1. 1.) festgestellte Initiation der RNA-Synthese am Gen A - Promotor wider.
Betrachtet man die Fragmente 6a, 6b und 6c, so kann eine spezifische Komplexbildung von M.luteus Polymerase mit Fragment 6a weitgehend ausgeschlossen werden, da die Transkription des Restriktionsfragments Hae III/2 (3122/4199), welches das Fragment HindII/6a (3355/3699) einschließt, keinen Hinweis darauf ergibt (Abschnitt A.1.2.).

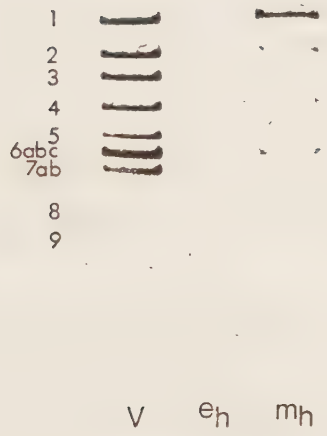


Fig. 13. Bildung von stabilen Komplexen aus øX174 HindII-Fragmenten und den RNA Polymerasen aus M.luteus und E.coli

Stabile Initiationskomplexe aus RNA Polymerase und øX174 HindII-Fragmenten (molares Polymerase:DNA-Verhältnis = 50:1) wurden durch Bindung an Cellulosenitratfilter isoliert. Nach Elution vom Filter wurden die Restriktionsfragmente auf einem 2.5 % Polyacrylamid-0.5 % Agarose-Gel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt (vgl. Methoden, Abschnitte 1.2. und 6.).

e_h: HindII-Fragmente, die stabile Komplexe mit RNA Polymerase aus E.coli bilden

m_h: HindII-Fragmente, die stabile Komplexe mit RNA Polymerase aus M.luteus bilden

V: Vergleich: Fragmente von øX174 RF DNA nach Spaltung mit HindII (vgl. auch Fig. 1.)

Hier sei noch eine mehr die Methode betreffende Bemerkung zu Fig. 13. angeschlossen:
Die auffallende, anscheinend generelle Bindung der RNA Polymerasen an größere Restriktionsfragmente dürfte auf zwei sich überlagernden Effekten beruhen:

1) Das relativ hohe molare Polymerase-DNA-Verhältnis von 50 : 1, das wichtig ist zur Erfassung aller Bindungsstellen, begünstigt eine artifizielle Bildung von stabilen Initiationskomplexen, etwa an den Enden der DNA-Fragmente. Für diese Hypothese spricht die Beobachtung einer undifferenzierten Komplexbildung von Restriktionsfragmenten mit Core-Polymerase aus E.coli (ohne Beleg; vgl. auch Talkington und Pero, 1978).

2) Bei der Sichtbarmachung von DNA-Fragmenten mit Ethidiumbromid ist die Intensität einer DNA-Bande im Gel proportional der Länge des Fragments; die Folge ist eine geringere Sensitivität der Methode im Bereich kleiner DNA-Fragmente.

Führt man den oben geschilderten Versuch in Abwesenheit von RNA Polymerase durch, läßt sich keine Bindung von DNA-Fragmenten an das Filter erkennen.

2. Bindung an øX174 Alu I-Fragmente

Die Restriktionsendonuklease Alu I erzeugt bei der Spaltung von øX174 RF DNA 24 Fragmente in einem Längenbereich von 9 bis 1007 Basenpaaren (Jeppesen et al., 1976; Sanger et al., 1977).
Dieses Alu I-Fragmentgemisch wurde mit den RNA Polymerasen aus E.coli und M.luteus im Filterbindungs-Ansatz (Methoden, Abschnitt 6.) inkubiert und anschließend wurden die filtergebundenen DNA-Fragmente im Gel analysiert (Fig. 14.).

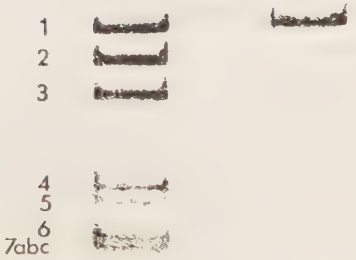


Fig. 14. Bildung von stabilen Komplexen aus øX174 Alu I-Fragmenten und den RNA Polymerasen aus M.luteus und E.coli

Isolierung und Analyse komplexgebundener DNA erfolgten wie in Legende zu Fig. 13. beschrieben.

e_h: Alu I-Fragmente, die stabile Komplexe mit RNA Polymerase aus E.coli bilden

m_h: Alu I-Fragmente, die stabile Komplexe mit RNA Polymerase aus M.luteus bilden

V: Vergleich: Fragmente von øX174 RF DNA nach Spaltung mit Alu I (vgl. auch Fig. 1.)

Intensität und Auflösung der DNA-Banden lassen zwar eine sichere Aussage nur für die drei längeren Alu I-Fragmente 1, 2 und 3 zu, doch wird hier gerade an Fragment 1 ein

enormer Unterschied zwischen den beiden Polymerasen in der Komplexbildung sichtbar.
Dieser Befund deckt sich auch mit dem Ergebnis der Analyse von HindII-Fragmenten (vgl. Abschnitt C.1.), da das Fragment Alu I/1 (447/1456) Fragment HindII/6b (954/1294) vollständig und den größten Teil von Fragment HindII/6c (322/656) einschließt.

Die ausgeprägte Präferenz, mit der M.luteus Polymerase gegenüber dem Enzym aus E.coli an das Fragment Alu I/1 (447/1456) bindet, deutet auf eine hochgradige Spezifität in der Wechselwirkung von M.luteus Polymerase mit einer oder mehreren DNA-Sequenzen in diesem Bereich des Genoms hin.

3. Bindung an øX174 Hae III-Fragmente

Zur weiteren Eingrenzung von DNA-Regionen, die sich möglicherweise durch einen erhöhten Grad an speziesspezifischer Promotor-Polymerase-Wechselwirkung auszeichnen, wurde ein Gemisch der beim Abbau von øX174 RF DNA mit dem Restriktionsenzym Hae III entstehenden Fragmenten mittels Filterbindung analysiert (Fig. 15.).

Beide Polymerase-Spezies zeigen auch hier deutliche Präferenzen in der Komplexbildung mit bestimmten DNA-Fragmenten. In signifikant größerer Menge bindet Fragment Hae III/2 (3122/4199) das E.coli-Enzym; darin drückt sich offenbar eine bevorzugte Bildung des Initiationskomplexes am Gen A Promotor durch E.coli RNA Polymerase aus (vgl. Abschnitt A.1.2.).

Quantitative Unterschiede im Sinne einer erhöhten Bindungstendenz von M.luteus Polymerase lassen die Hae III-Fragmente 1 (1780/3121) und 4 (1174/1779) erkennen.

In mehrfacher Hinsicht äußerst interessant erscheint hier ein relativ kleines DNA-Fragment, das Fragment Hae III/7 (436/669):

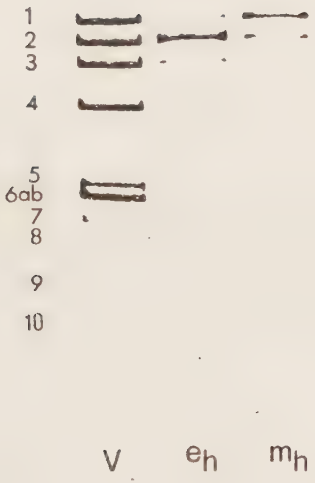


Fig. 15. Bildung von stabilen Komplexen aus øX174 Hae III-Fragmenten mit den RNA Polymerasen aus M.luteus und E.coli

Zur Isolierung und Analyse komplexgebundener DNA vgl. Legende zu Fig. 13.

e_h: Hae III-Fragmente, die stabile Komplexe mit RNA Polymerase aus E.coli bilden

m_h: Hae III-Fragmente, die stabile Komplexe mit RNA Polymerase aus M.luteus bilden

V: Vergleich: Fragmente von øX174 RF DNA nach Spaltung mit Hae III (vgl. auch Fig. 1.)

1) Dieses Fragment bildet ganz spezifisch nur mit der RNA Polymerase aus M.luteus einen stabilen Komplex; eine Bindung des E.coli-Enzyms kann innerhalb der Nachweisgrenzen nicht beobachtet werden.

2) Das Fragment ist fast vollständig in dem wegen seiner hohen Bindungspräferenz für M.luteus Polymerase auffallenden Fragment Alu I/1 (447/1456) enthalten (vgl. Abschnitt C.2. und Fig. 14.).

3) Die in Relation zur Länge des Fragments hohe Intensität der Ethidiumbromidfluoreszenz der entsprechenden DNA-Bande bedeutet die Existenz eines oder mehrerer Sequenzbereiche mit einer den restlichen Hae III-Fragmenten gegenüber herausragenden Effizienz in der Komplexbildung mit M.luteus RNA-Polymerase.

Der Vergleich der RNA Polymerasen aus E.coli und M.luteus hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Bildung stabiler Initiationskomplexe mit denselben øX174 DNA-Fragmenten läßt somit ein breites Spektrum in der Enzym-DNA-Interaktion erkennen, das von sehr ähnlichem Verhalten über Unterschiede quantitativer Art bis zur ausgeprägten Speziesspezifität reicht.

D. Transkription von Restriktionsfragmenten mit hoher Spezifität in der RNA Polymerase-DNA-Bindung

1. Transkription des Fragments Hae III/7

Durch Analyse verschiedener øX174-Restriktionsfragmente, die eine hohe Neigung zur Formation stabiler Initiationskomplexe mit RNA Polymerase zeigen, konnte im vorangegangenen Abschnitt mit dem Fragment Hae III/7 (436/669) ein Bereich des Phagen-Genoms von ca. 250 Nukleotiden eingegrenzt werden, der sich durch einen hohen Grad an spezifischer Komplexbildung mit M.luteus RNA Polymerase auszeichnet.

Die dabei angewandte Filterbindungstechnik erlaubt nun allerdings keine Aussage über die Anzahl der im Mittel pro DNA-Fragment gebundenen Enzymmoleküle und damit die Zahl der auf einem Fragment befindlichen Promotorregionen.

Aus diesem Grund wurde das Fragment Hae III/7 (436/669) nach einer etwas abgewandelten Vorschrift von Ledeboer et al. (1978) isoliert und in zwei parallelen Ansätzen unter identischen Bedingungen (37°C, 0.2 mol KCl/l) im in vitro-Transkriptionssystem in Gegenwart von α-^{32}P-markiertem UTP mit den RNA Polymerasen aus E.coli bzw. M.luteus inkubiert. Nach Gelelektrophorese an einem denaturierenden Polyacrylamidgel und anschließender Autoradiographie wurde folgendes Ergebnis erhalten (Fig. 16.):

M.luteus Polymerase katalysiert mit bemerkenswert hoher Rate die Synthese eines RNA-Produkts (^{H}E), das als eine einzige diskrete Bande im Gel wandert.
Demgegenüber läßt sich im Falle von E.coli Polymerase weder die Synthese einer RNA vergleichbarer elektrophoretischer Mobilität noch irgendeines anderen RNA-Produkts feststellen.

Dieses Resultat bestätigt zunächst genau einen wesentlichen Befund aus dem in Abschnitt C.3. beschriebenen Filterbin-

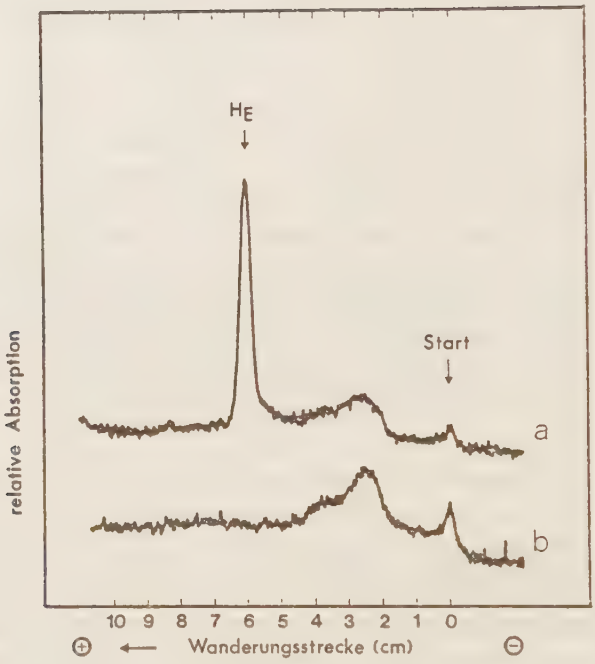


Fig. 16. Analyse der Transkripte von øX174-Restriktionsfragment Hae III/7

Transkription (Standardsystem) und Auftrennung der RNA in einem denaturierenden 8 % Polyacrylamidgel erfolgten wie in Methoden, Abschnitte 1.3. und 4. beschrieben.

a: RNA-Synthese mit RNA Polymerase aus M.luteus

b: RNA-Synthese mit RNA Polymerase aus E.coli

dungsexperiment (vgl. Fig. 15.).

Das Auftreten einer diskreten Bande im Gel bedeutet aber noch nicht, daß es sich um ein einziges, homogenes RNA-Produkt handelt. Eine Analyse der RNA ^{H}E in einem hochauflösenden 15 %igen Polyacrylamidgel gab allerdings keinen Hin-

weis auf die Anwesenheit einer weiteren, in der beobachteten Bande enthaltenen RNA-Spezies (ohne Beleg).

2. Vergleich der RNA-Syntheseraten

Die RNA Polymerase aus E.coli unterscheidet sich in der Erkennung von Promotoren nicht grundlegend von M.luteus Polymerase (vgl. Abschnitt A.). Daher ist anzunehmen, daß auch die RNA-Spezies ^{H}E mit einer geringen, unter der Nachweisgrenze der Autoradiographie liegenden Rate durch E.coli Polymerase synthetisiert wird.

Um das Verhältnis der Syntheseraten quantitativ zu erfassen, wurde die RNA-Bande sowie der entsprechende Bereich bei den E.coli-Produkten aus dem Gel (Fig. 16.) ausgeschnitten und jeweils der Einbau von radioaktiv markiertem [α-^{32}P] UMP anhand der Čerenkov-Strahlung gemessen (Tab. 1.).

Aus den korrigierten Werten (vgl. Legende zu Tab. 1.) geht hervor, daß E.coli Polymerase nur 1.2 % der Rate erreicht, mit der das M.luteus-Enzym die Synthese der RNA ^{H}E katalysiert.
In Abwesenheit der DNA-Matrize wird bei sonst gleichen Versuchsbedingungen keine RNA-Synthese beobachtet (Tab. 1.).

Geht man von einer vergleichbaren Geschwindigkeit der beiden Polymerasen in der Elongationsreaktion aus, ist der Prozeß der RNA-Initiation für die 80-fach höhere Syntheserate der RNA ^{H}E durch M.luteus Polymerase verantwortlich. Das heißt, daß die Ursache dieses eklatanten Unterschieds in den Faktoren, die beim Initiationsvorgang eine Rolle spielen, bzw. in deren Zusammenwirken begründet sein muß.

Polymerase	Matrize	Einbau von [α-^{32}P]UMP in RNA ^{H}E		
		Ipm $_{ges.}$	Ipm $_{backgr.}$	Ipm $_{korr.}$
E.coli	Hae III/7	1308	931	377
M.luteus	Hae III/7	32642	1995	30647
E.coli	-	59	71	0

Tab. 1. Vergleich der Syntheseraten des Hae III/7-Transkripts ^{H}E durch die RNA Polymerasen aus M.luteus und E.coli

Zur Bestimmung der relativen RNA-Syntheseraten wurde nach Auftrennung der RNA im Gel (Fig. 16.) jeweils der Bereich, der die ^{32}P-markierte RNA ^{H}E enthielt, aus dem Gel ausgeschnitten und die Čerenkov-Strahlung gemessen. Um den Anteil an Strahlung, der durch diffus verteiltes radioaktives Material im Gel hervorgerufen wird, zu ermitteln, wurde jeweils die in den Gelabschnitten ober- und unterhalb der RNA-Bande enthaltene Radioaktivität bestimmt. Aus der Differenz der Gesamtradioaktivität im Bereich der RNA-Bande (Ipm ges.) und dem mittleren Wert der Radioaktivität in den benachbarten Gelabschnitten (Ipm backgr.) wurde der radioaktive Einbau in spezifische RNA (Ipm korr.) errechnet.

3. Einfluß der Salzkonzentration auf die Transkriptionsspezifität

Änderungen in der Salzkonzentration haben eine starke Wirkung in der Transkription auf der Stufe der Polymerase-DNA-Bindung (Seeburg et al., 1977), der Initiation (Mangel und Chamberlin, 1974), der Elongation (Bremer, 1970) sowie der Termination und Reinitiation (Millette et al., 1970; Maitra et al., 1970). Auch individuelle Promotoren, z.B. auf T7 DNA, werden durch die Salzkonzentration in ihrer Effizienz unterschiedlich beeinflußt (Dausse et al., 1976;

Miller und Burgess, 1978).

In den bisherigen Experimenten wurde die Transkription stets bei der relativ hohen Salzkonzentration von 0.2 mol KCl/l durchgeführt. Hier soll nun untersucht werden, ob die hohe Speziesspezifität in der Ablesung des DNA-Fragments Hae III/7 durch M.luteus bzw. E.coli-RNA-Polymerase bei Erniedrigung der Ionenstärke erhalten bleibt oder ob dadurch die Synthese einer spezifischen RNA durch E.coli Polymerase ermöglicht wird.
Zu diesem Zweck wurde das isolierte Fragment Hae III/7 durch die beiden Polymerase-Spezies bei verschiedenen KCl-Konzentrationen zwischen 0.05 und 0.2 mol KCl/l transkribiert (Fig. 17.).
Man sieht, daß bei allen untersuchten Salz-Konzentrationen nur M.luteus Polymerase in der Lage ist, spezifisch die Synthese der RNA ^{H}E zu katalysieren.
Ein Optimum der spezifischen RNA-Synthese wird bei 0.15 mol KCl/l beobachtet, während die Menge an heterogenem Produkt am geringsten bei 0.2 mol KCl/l ist und mit abnehmender Ionenstärke zunimmt.
Interessant ist hier auch - im Zusammenhang mit dem in Abschnitt A.3.2. erörterten Problem des radioaktiven Materials auf der Geloberfläche -, daß die Menge an der Startstelle der Elektrophorese befindlicher radioaktiver Produkte sowohl bei E.coli- wie auch bei M.luteus-Polymerase von der Ionenstärke im in vitro-Transkriptionssystem abhängt.

Damit erscheint es ausgeschlossen, daß die Speziesspezifität in der Synthese der RNA ^{H}E auf einer unterschiedlichen Sensitivität der Polymerasen gegenüber hohen Salzkonzentrationen und einem dadurch bedingten Stabilitätsunterschied der Enzym-DNA-Komplexe beruht.

Die optimale Synthese der RNA ^{H}E bei einer KCl-Konzentration von 0.15 mol KCl/l stimmt mit dem Wert überein, den Fuchs et al. (1967) für das RNA-Synthese-Maximum bei Transkription von T4 DNA durch E.coli Polymerase ermittelten.

Fig. 17. Einfluß der Salzkonzentration auf die Transkriptionsspezifität

Die Transkription des Restriktionsfragments Hae III/7 wurde im Standardtestsystem (Methoden, Abschnitt 4.) bei den unten angegebenen KCl-Konzentrationen durchgeführt. Die Auftrennung der RNA erfolgte in einem denaturierenden 8 %igen Polyacrylamidgel (Methoden, Abschnitt 1.3.).

a, c, e, g : RNA-Synthese mit RNA Polymerase aus E.coli

b, d, f, h : RNA-Synthese mit RNA Polymerase aus M.luteus

Salzkonzentrationen: a, b : 50 mmol KCl/l
c, d : 100 mmol KCl/l
e, f : 150 mmol KCl/l
g, h : 200 mmol KCl/l

Das bedeutet, daß der Gesamtablauf der RNA-Synthese durch die Ionenstärke bei beiden Polymerase-Spezies in gleicher Weise beeinflußt wird.

4. Lokalisierung der RNA ^{H}E auf dem øX174-Genom

4.1. Transkription der Restriktionsfragmente Alu I/1, Mbo II/7 und Taq I/5

Da die Variation der Ionenstärke, wie im vorhergehenden Abschnitt gezeigt, keinen Hinweis darauf ergibt, daß die Ablesespezifität der RNA ^{H}E durch die Wahl spezieller experimenteller Bedingungen verursacht wird, liegt die Vermutung nahe, daß Unterschiede in der Struktur der RNA Polymerasen (Leib, 1979) eine unterschiedliche Erkennung von DNA-Signalregionen auf der Basis der Nukleotidsequenz zur Folge haben.
Um diese Hypothese zu testen, ist es nötig, die Startstelle der RNA ^{H}E auf dem Phagengenom möglichst genau zu definieren und anhand der bekannten DNA-Sequenz (Sanger et al., 1977) nach strukturellen Besonderheiten im Bereich der RNA-Initiationsstelle zu suchen.

Aus Fig. 1. ist ersichtlich, daß das auf dem viralen DNA-Strang linke Ende des bereits erwähnten Restriktionsfragments Alu I/1 (447/1456) (vgl. Abschnitt C.2.) mit dem linken Ende des Fragments Hae III/7 (436/669) fast zusammenfällt, daß aber das rechte Ende von Alu I/1 um 787 Nukleotide über dasjenige von Hae III/7 hinausreicht.

Transkription des isolierten Fragments Alu I/1 (447/1456) durch die Polymerasen aus E.coli und M.luteus und anschliessende Analyse der Produkte auf einem 2.5 % Polyacrylamid-0.5 % Agarose-Gel liefert im Wesentlichen eine einzige, spezifisch durch M.luteus Polymerase abgelesene RNA-Spezies (Fig. 18.).

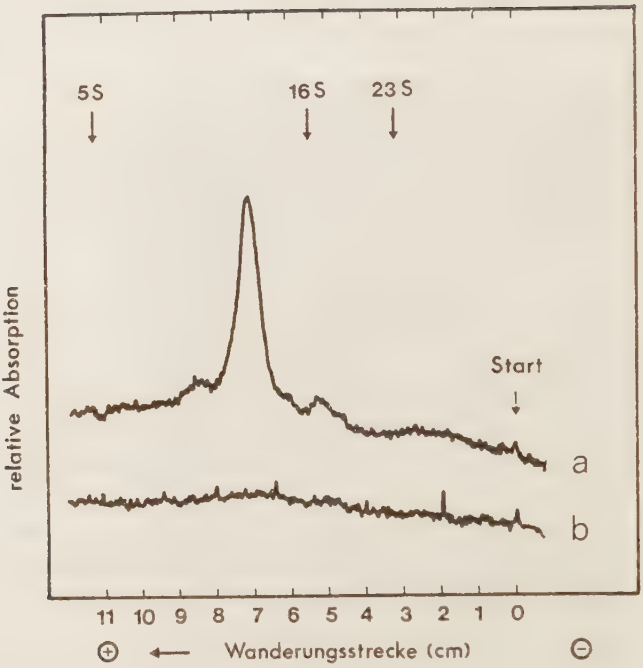


Fig. 18. Analyse der Transkripte von øX174-Restriktionsfragment Alu I/1

Die Transkriptionsbedingungen (Standardsystem) sind in Methoden, Abschnitt 4., beschrieben. Die Auftrennung der RNA erfolgte in einem 2.5 % Polyacrylamid - 0.5 % Agarose-Gel. Als Marker zur Abschätzung der RNA-Längen dienten 5S rRNA (120 Nukleotide) sowie 16S rRNA (ca. 1700 Nukleotide) und 23S rRNA (ca. 3700 Nukleotide).

a: RNA-Synthese mit RNA Polymerase aus M.luteus

b: RNA-Synthese mit RNA Polymerase aus E.coli

Die Mobilität der RNA-Bande in der Elektrophorese liegt zwischen den Wanderungsstrecken von 16S rRNA (ca. 1700 Nukleotide) und 5S rRNA (120 Nukleotide); innerhalb dieses

Bereichs ist aufgrund fehlender geeigneter Längenstandards nur eine grobe Abschätzung von Transkriptlängen möglich. Die Länge der hier betrachteten RNA beträgt danach ungefähr 900 Nukleotide.

Unterstellt man, was aufgrund der hohen Spezies-Spezifität in der Ablesung begründet erscheint, daß das Haupttranskript der Alu I/1-Ablesung an derselben Stelle initiiert wird wie die an Fragment Hae III/7 abgelesene RNA ^{H}E, ergibt sich aus der RNA-Länge eindeutig, daß M.luteus RNA-Polymerase den nichtviralen Minus-Strang von øX174 RF DNA als Matrize benutzt. Es ist bekannt, daß auch E.coli Polymerase in vivo ausschließlich den Minus-Strang dieser DNA transkribiert (Hayashi et al., 1963); dies bedeutet, daß sich die beiden Polymerasen nicht in der Spezifität der Strangselektion unterscheiden.
Ungeachtet der Unsicherheit in der Längenbestimmung zeigt dieser Versuch weiter, daß sich in einem DNA-Bereich, der den überwiegenden Teil des Fragments Alu I/1 (447/1456) umfaßt, keine Faktor-unabhängige Terminationsstelle für M.luteus RNA Polymerase befindet.

Zur Untermauerung der bisherigen Ergebnisse wurden zwei weitere Restriktionsfragmente aus derselben øX174 Gen D-Region als Matrize verwendet.
Das Restriktionsenzym Mbo II erzeugt bei der Spaltung von øX174 RF DNA ein Fragment Mbo II/7 (493/816), welches, den viralen Plus-Strang betrachtet, das Promotor-aktive Fragment Hae III/7 (436/669) am linken Ende um 57 Basenpaare verkürzt enthält und insgesamt 324 Basenpaare lang ist (Fig. 19.).
Ein zweites Fragment, das bei der Spaltung der Phagen-DNA mit dem Restriktionsenzym Taq I entsteht, das Fragment Taq I/5 (491/721), stimmt am linken Ende bis auf zwei Basenpaare mit dem Fragment Mbo II/7 (493/816) überein, ist jedoch nur 231 Basenpaare lang (Fig. 19.).

Bei Inkubation des isolierten Fragments Mbo II/7 mit RNA-

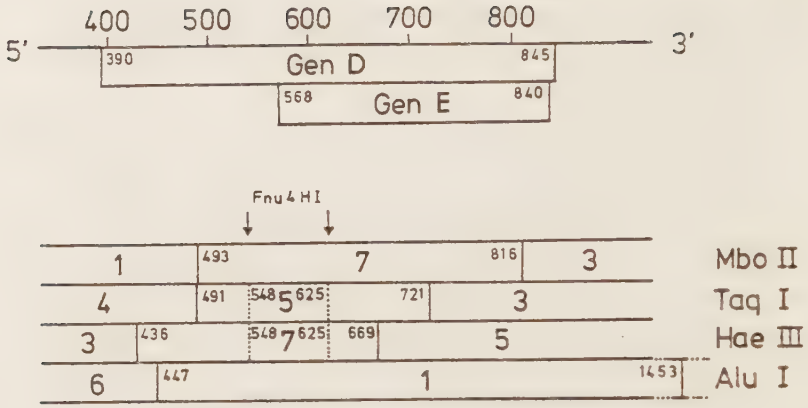


Fig. 19. Spaltstellen der Restriktionsenzyme Mbo II, Taq I, Hae III und Alu I auf øX174 RF DNA im Bereich der Gene D und E

Die Anordnung der Gene und der DNA-Fragmente sowie die Numerierung der Basen wurde aus Sanger et al. (1977) übernommen.

Polymerase aus M.luteus im Transkriptionssystem und Auftrennung der Transkripte im Gel erhält man eine distinkte RNA-Spezies (^{M}E), während mit E.coli Polymerase nur eine diffuse Zone radioaktiven Materials beobachtet wird (Fig. 20.).

Führt man den Versuch mit Fragment Taq I/5 als Matrize aus, findet man qualitativ das gleiche Bild (Fig. 21.): Wieder steht einer diskreten, intensiven RNA-Bande (^{T}E) auf Seiten des M.luteus-Enzyms eine geringe Menge an heterogenem Produkt bei E.coli Polymerase gegenüber.

Den Zusammenhang zwischen den einzelnen M.luteus-spezifischen Transkripten muß eine nähere Charakterisierung dieser Transkripte klären.

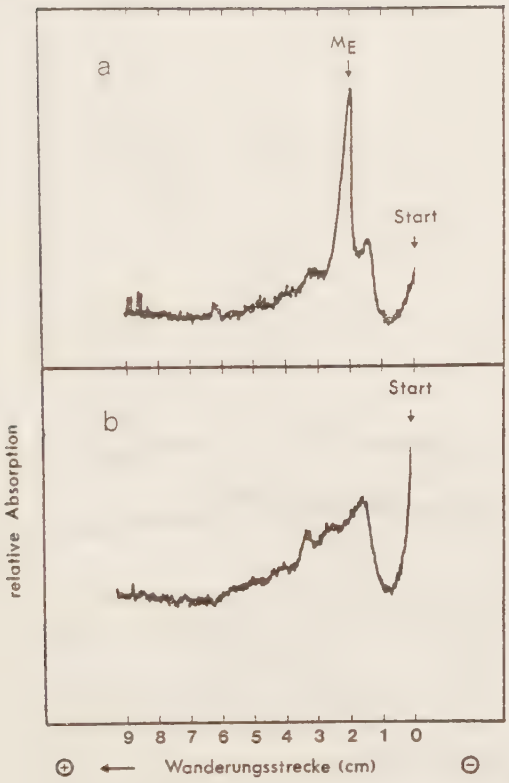


Fig. 20. Analyse der Transkripte von øX174-Restriktionsfragment Mbo II/7

Transkription (Standardsystem) und Auftrennung der RNA im denaturierenden 8 % Polyacrylamid-Gel erfolgten wie in Methoden, Abschnitte 1.3. und 4., beschrieben. Die ^{32}P-markierte RNA wurde durch Autoradiographie lokalisiert und die RNA-Banden wurden densitometrisch aufgezeichnet.

a: RNA-Synthese mit RNA Polymerase aus M.luteus

b: RNA-Synthese mit RNA Polymerase aus E.coli

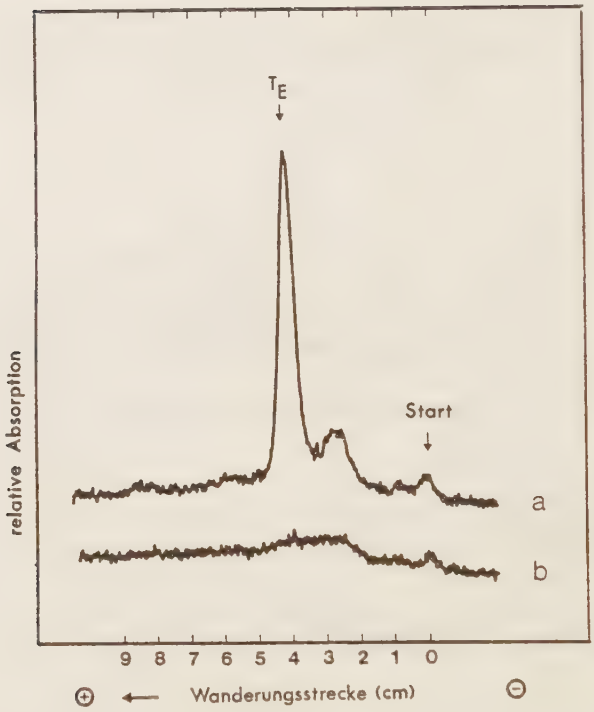


Fig. 21. Analyse der Transkripte von øX174-Restriktionsfragment Taq I/5

Zur Versuchsdurchführung vgl. Legende zu Fig. 20.
a: RNA-Synthese mit RNA Polymerase aus M.luteus
b: RNA-Synthese mit RNA Polymerase aus E.coli

4.2. Eingrenzung der Startstelle der RNA E anhand der Transkriptlängen

Zur Bestimmung der Längen der von den verschiedenen Restriktionsfragmenten abgelesenen RNAs wurden bei der Auftrennung der Produkte gleichzeitig die Wanderungsstrecken definier-

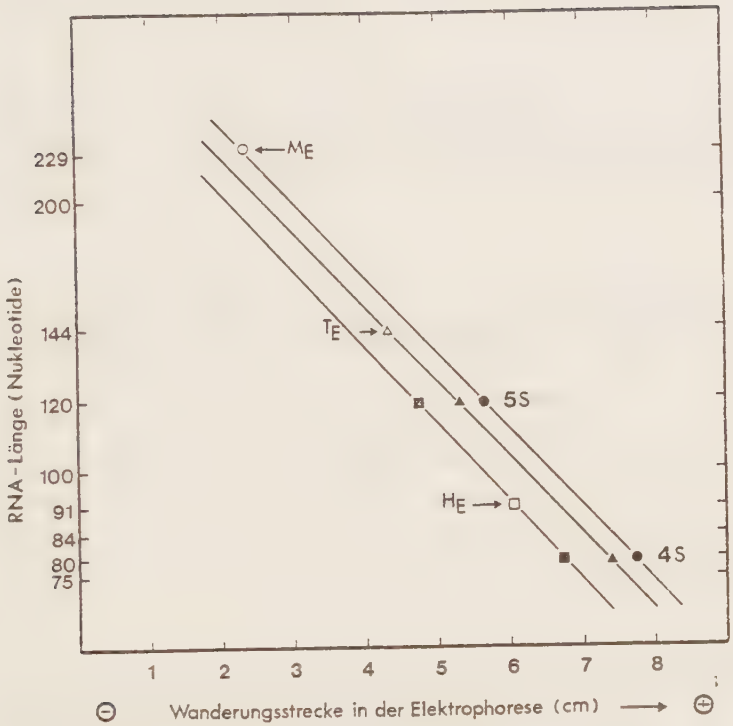


Fig. 22. Bestimmung der Längen spezifisch durch M.luteus RNA Polymerase synthetisierter RNAs

Der Längenbestimmung der RNAs durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde eine lineare Beziehung zwischen der Wanderungsstrecke einer RNA im denaturierenden Gel (vgl. Methoden, Abschnitt 1.3.) und dem Logarithmus der Anzahl der Nukleotide dieser RNA zugrundegelegt.

Längen-Marker: 4S ($tRNA^{val}$, $tRNA^{tyr}$: mittlere Länge 80 Nukleotide)
5S (5S rRNA aus E.coli: 120 Nukleotide)

M_E (-o-): M.luteus-spezifisches Transkript von Restriktionsfragment Mbo II/7

T_E (-△-): M.luteus-spezifisches Transkript von Restriktionsfragment Taq I/5

H_E (-□-): M.luteus-spezifisches Transkript von Restriktionsfragment Hae III/7

ter RNAs, nämlich 5S rRNA aus E.coli (120 Nukleotide) und Valin- sowie Tyrosin-spezifischer tRNAs (75 bzw. 84 Nukleotide) im Gel bestimmt [2].

Auf diese Weise wurde für das Hae III/7-Transkript ^{H}E eine Länge von ca. 90 Nukleotiden, für das Mbo II/7-Transkript ^{M}E von ca. 230 Nukleotiden und für das Taq I/5-Transkript ^{T}E von ungefähr 140 Nukleotiden ermittelt (Fig. 22. und Tab. 2.).

DNA-Matrize (Restr.fragm.)	Position auf d. Genkarte (nach Sanger et al.,1977)	Länge der ^{m}h-spez. RNA (Nu)
Alu I/1	447 - 1456	ca. 900
Hae III/7	436 - 669	90 (^{H}E)
Mbo II/7	493 - 816	230 (^{M}E)
Taq I/5	491 - 721	140 (^{T}E)

Tab. 2. Korrelation der Positionen transkribierter øX174-Restriktionsfragmente auf dem Genom mit den Längen der jeweils spezifisch durch M.luteus RNA Polymerase (^{m}h) erzeugten RNAs

Die angegebenen RNA-Längen wurden aus Fig. 22. entnommen.

2) Da die Sekundärstruktur und die zum Teil ungewöhnliche Basenzusammensetzung der tRNAs die elektrophoretische Mobilität stark beeinflussen, wurde dem Mittelwert der Laufstrecken der beiden tRNAs eine Länge von 80 Nukleotiden zugeordnet. Auch basengepaarte Regionen in 5S rRNA wirken sich auf die Wanderung in der Elektrophorese aus. Der insgesamt daraus resultierende Fehler innerhalb des untersuchten Längenbereichs dürfte, wie aus mehreren unabhängigen Versuchen abgeschätzt wurde, maximal etwa $\pm$15 Nukleotide betragen.

Aus der Restriktionskarte des viralen Plus-Strangs (Fig. 19. und Tab. 2.) geht hervor, daß das rechte Ende des Fragments Taq I/5 um 52 Basenpaare und das des Fragments Mbo II/7 um 147 Basenpaare über das rechte Ende des Fragments Hae III/7 hinausreichen. Diese Werte entsprechen innerhalb der Fehlergrenzen (vgl. Fußnote 2)) den Längendifferenzen der an den jeweiligen DNA-Fragmenten abgelesenen RNA-Spezies.

Damit liegt der Schluß nahe, daß die Synthese aller in Tab. 2. angeführten RNAs an derselben Stelle des Phagengenoms startet und am 5'-Ende des jeweiligen Matrizenstrangs terminiert.
Ordnet man dementsprechend die spezifischen RNAs den zugehörigen DNA-Bereichen zu, muß sich die gemeinsame RNA-Startstelle innerhalb eines 30 Basenpaare langen DNA-Abschnitts, zwischen den Positionen 570 und 600 des Phagengenoms (ausgehend von der einzigen Schnittstelle des Restriktionsenzyms Pst I als Nullpunkt; vgl. Sanger et al., 1977), befinden.

Die Restriktionsendonuklease Fnu4H-I besitzt zwei Schnittstellen innerhalb der Fragmente Hae III/7 (436/669) und Taq I/5 (491/721) an den Positionen 548 und 625 des øX174-Genoms, wie aus der von Sanger et al. (1977) bestimmten Nukleotidsequenz ersichtlich ist. Dieses Enzym erzeugt bei der Spaltung von Hae III/7 und Taq I/5 jeweils drei Subfragmente, von denen die beiden auf der Genkarte in der Mitte liegenden identisch sind und eine Länge von 77 Basenpaaren aufweisen (Fig. 19.).

Dazu wurde nun folgende Überlegung angestellt:
Inkubiert man in zwei parallelen Ansätzen die Fragmentgemische, die bei der Fnu4H-I-Spaltung von Fragment Hae III/7 bzw. Taq I/5 entstehen, mit M.luteus RNA Polymerase im in vitro-Transkriptionssystem, so ist, da die vermutete Startstelle der RNA E in dem oben erwähnten 77 Basenpaar-Fragment liegt, in beiden Ansätzen die Synthese einer RNA gleicher

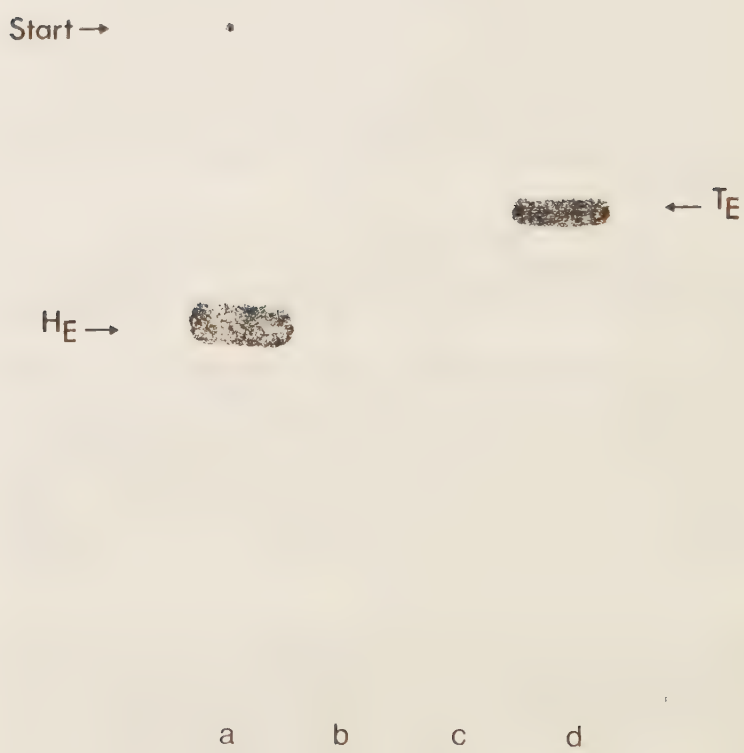


Fig. 23. Transkription von øX174-Restriktionsfragmenten, die bei Spaltung der Fragmente Hae III/7 bzw. Taq I/5 mit dem Restriktionsenzym Fnu4H-I entstehen, durch M.luteus RNA Polymerase

Je 1.6 pmol Restriktionsfragmente Hae III/7 und Taq I/5 wurden mit 6 Einheiten Fnu4H-I gespalten (Methoden, Abschnitt 2.) und die beiden Fragmentgemische parallel im Standardtestsystem (Methoden, Abschnitt 4.) mit je 6.5 pmol M.luteus RNA Polymerase inkubiert. Als Vergleich wurden identische Mengen der ungespaltenen Fragmente Hae III/7 und Taq I/5 unter obigen Bedingungen transkribiert. Die RNA wurde im denaturierenden 8 % Polyacrylamid-Gel (Methoden, Abschnitt 1.3.) aufgetrennt.

Länge zu erwarten. Länge der RNA und Intensität der entsprechenden Banden bei Autoradiographie sollten in etwa halb so groß sein wie die der unter gleichen Bedingungen an Fragment Hae III/7 abgelesenen RNA ^{H}E.

Das Resultat dieses Experiments zeigt Fig. 23.: Es ist zwar eine geringe Synthese nicht näher definierter RNA-Produkte zu erkennen, jedoch keine RNA, die den oben aufgeführten Erwartungen entspricht.

Hält man an der Richtigkeit der bisher entwickelten Vorstellungen fest, ergibt sich als Konsequenz, daß einer der Schnitte des Restriktionsenzyms Fnu4H-I einen zur RNA-Initiation wichtigen Sequenzbereich trennt.

---

zu Fig. 23.:
a: Transkripte von Fragment Hae III/7
b: Transkripte von Fnu4H-I-gespaltenem Fragment Hae III/7
c: Transkripte von Fnu4H-I-gespaltenem Fragment Taq I/5
d: Transkripte von Fragment Taq I/5

5. Ermittlung der Startstelle der RNA $^{H}_{E}$ auf dem øX174-Genom

5.1. Bestimmung des Startnukleotids

Eine Voraussetzung für die Identität der Initiationsstellen der in Tab. 2. zusammengefaßten RNA-Spezies ist, daß diese im Startnukleotid übereinstimmen.

Die RNA-Synthese startet *in vitro* wie *in vivo* gewöhnlich mit dem Einbau eines intakten Purinnukleosidtriphosphats, das den 5'-Terminus der wachsenden RNA-Kette bildet (Maitra und Hurwitz, 1965).
Zur Ermittlung des Startnukleotids des *Hae* III/7-Transkripts $^{H}_{E}$ (Fig. 16.) wurde das DNA-Fragment jeweils in Gegenwart von γ-^{32}P-markiertem ATP oder GTP mit *M.luteus* RNA Polymerase transkribiert und die Produkte am Polyacrylamidgel analysiert (Fig. 24.). Dabei zeigt sich, daß nur mit [γ-^{32}P]GTP ein radioaktiv markiertes RNA-Produkt erzeugt wird, das in der Länge mit dem Transkript $^{H}_{E}$ genau übereinstimmt (Fig. 24.).

Das entsprechende Ergebnis erhält man bei der Analyse der an den Fragmenten *Mbo* II/7 und *Taq* I/5 (vgl. Tab. 2.) abgelesenen RNAs (Fig. 25. und 26.).

Damit ist ein weiterer Hinweis auf eine einheitliche Startposition gegeben; die Bestimmung eines kurzen Sequenzbereichs am 5'-Ende der RNA-Spezies $^{H}_{E}$ sollte nun genügen, um eines der innerhalb des fraglichen DNA-Bereichs befindlichen 9 Guanosinphosphate als RNA-Startnukleotid zu identifizieren.

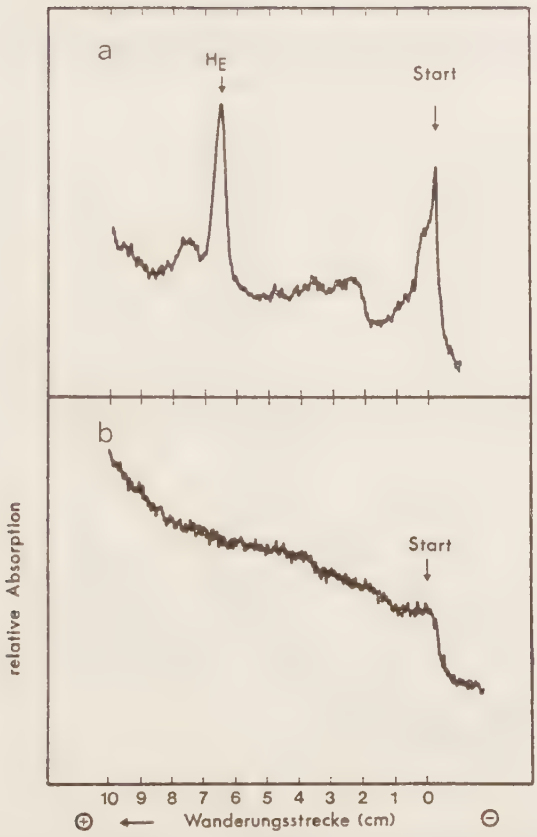


Fig. 24. Bestimmung des Startnukleotids des Hae III/7-Transkripts H_E

Die RNA-Synthese durch M.luteus RNA Polymerase wurde in Gegenwart von 0.15 mmol/l [γ-^{32}P]GTP (a) bzw. [γ-^{32}P]ATP (b) an Stelle von 0.6 mmol/l GTP bzw. ATP und mit unmarkiertem UTP (0.6 mmol UTP/l) statt [α-^{32}P]UTP durchgeführt wie in Methoden, Abschnitt 4., beschrieben. Die Auftrennung der RNA erfolgte analog Methoden, Abschnitt 1.3.

a: Transkription in Gegenwart von [γ-^{32}P]GTP

b: Transkription in Gegenwart von [γ-^{32}P]ATP

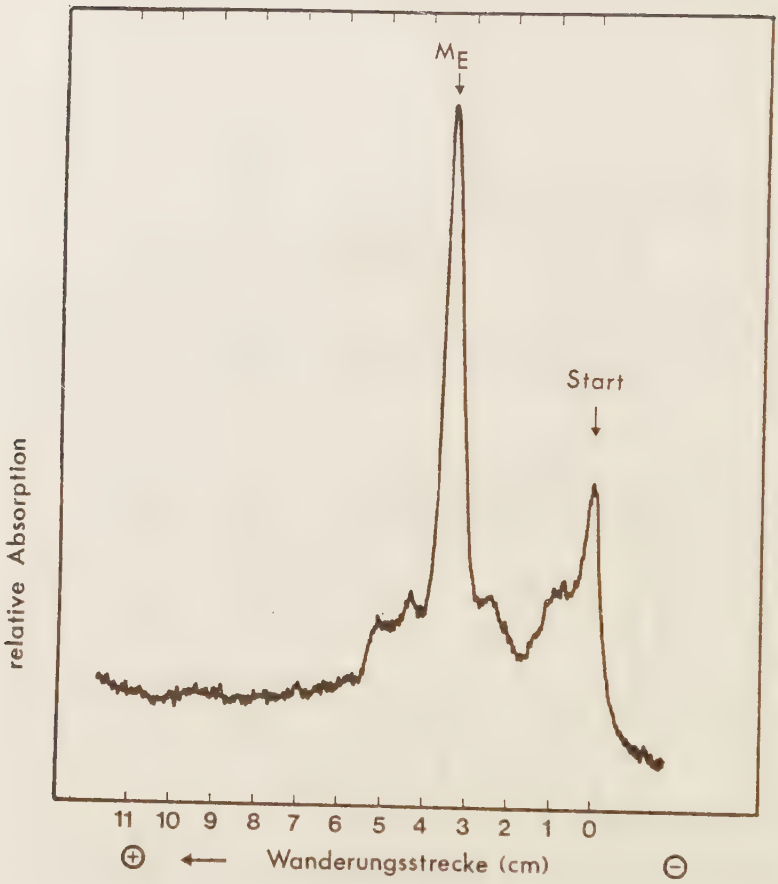


Fig. 25. Bestimmung des Startnukleotids des Mbo II/7-Transkripts $^{M}_{E}$

Zur Versuchsdurchführung vgl. Legende zu Fig. 24. (a).

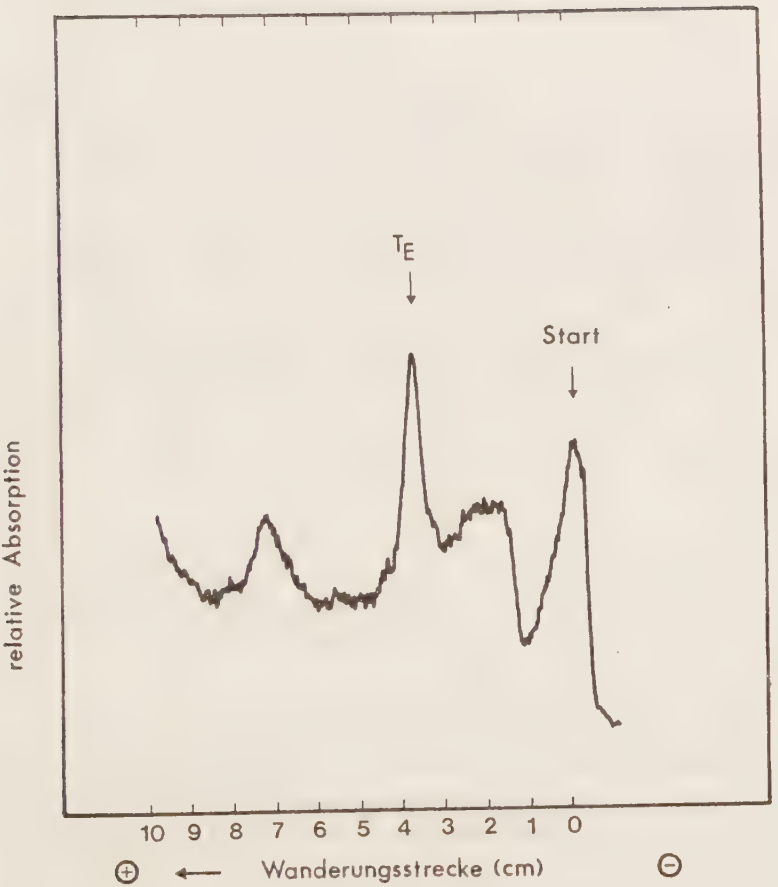


Fig. 26. Bestimmung des Startnukleotids des Taq I/5-Transkripts ^{T}E

Zur Versuchsdurchführung vgl. Legende zu Fig. 24. (a).

5.2. Spezifische Initiation mit Dinukleotiden

Downey et al. (1971) und Minkley u. Pribnow (1973) haben gezeigt, daß durch Initiation der in vitro-RNA-Synthese mit spezifischen Dinukleotiden eine Bestimmung von Nukleotidsequenzen in Promotorregionen möglich ist. Bei niedrigen, im mikromolaren Bereich liegenden Konzentrationen an initiierendem Purintriphosphat findet in einem gereinigten in vitro-Transkriptionssystem nur sehr wenig RNA-Synthese statt. Die RNA-Synthese kann jedoch stark stimuliert werden durch Zugabe geeigneter Dinukleotide in höheren Konzentrationen. Offenbar wirken die Dinukleotide durch Basenpaarung mit der DNA-Matrize an den RNA-Initiationsstellen (Downey und So, 1970), wobei an den freien 3'-OH Enden eine RNA-Kette auch bei geringen Substratkonzentrationen elongiert werden kann.
Mit Hilfe dieser Methode konnten die Sequenzen an den 5'-Enden von Lactose mRNA (Maizels, 1973), der frühen mRNAs des Bakteriophagen T7 (Minkley und Pribnow, 1973) und von in vitro-Transkripten des Phagen T4 (Rüger, 1978) ermittelt werden.

Die Identifizierung des Startnukleotids der RNA E als Guanosintriphosphat beschränkt zunächst die Zahl der für eine Stimulation der RNA-Synthese in Frage kommenden Dinukleotide auf diejenigen, die ein Guanosin, entweder in 3'- oder in 5'-Stellung, enthalten. Aus Versuchen von Minkley und Pribnow (1973) geht hervor, daß eine höhere Stimulation erreicht werden kann, wenn das normalerweise initiierende Nukleosid sich an der 3'-Position des Dinukleotids befindet.

Demnach wurde M.luteus RNA Polymerase mit dem Restriktionsfragment Taq I/5 (vgl. Abschnitt 4.1.) in Gegenwart jeweils eines der Dinukleotide GpG, ApG, CpG und UpG bei einer Konzentration von 0.2 mmol Dinukleotid/l und limitierten Substratkonzentrationen (ATP, [α-^{32}P]UTP, CTP: 25 µmol Nukleotid/l; GTP: 10 µmol GTP/l) 30 Minuten bei 37°C inkubiert.

Anschließend wurde die Konzentration der Triphosphate auf 0.3 mmol Nukleotid/l erhöht bei gleichzeitiger Zugabe von Rifampicin (Endkonzentration: 3.6 µg/ml) und weitere 10 Minuten bei 37°C inkubiert.

Die gelelektrophoretische Analyse der radioaktiven Produkte läßt erkennen, daß ausschließlich durch das Dinukleotid UpG die drastische Stimulierung der Synthese einer RNA bewirkt wird, die mit dem in einem parallelen Ansatz durch M.luteus Holoenzym an Taq I/5 spezifisch abgelesenen Transkript ^{T}E (vgl. Fig. 21.) in der Länge übereinstimmt (Fig. 27., 28.).

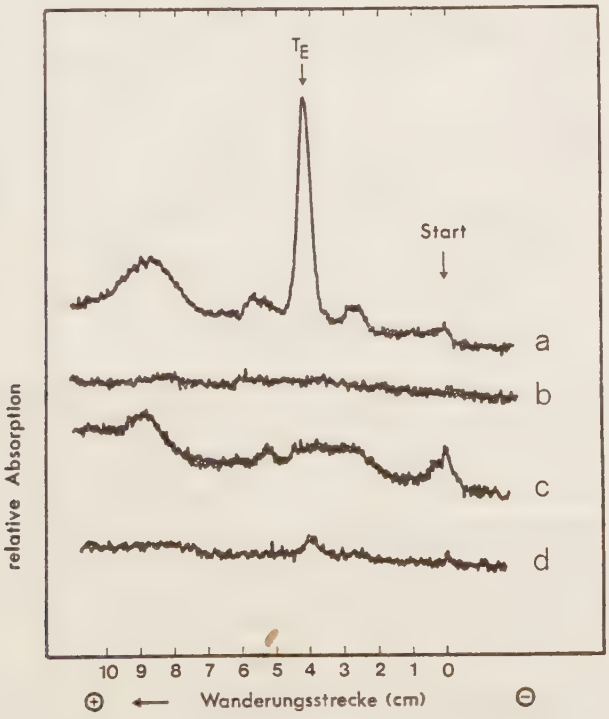


Fig. 27. Spezifische Initiation des Taq I/5-Transkripts ^{T}E mit Dinukleotiden (UpG, ApG, GpG, CpG)

RNA-Synthese in Gegenwart von UpG (a), ApG (b), GpG (c), CpG (d);

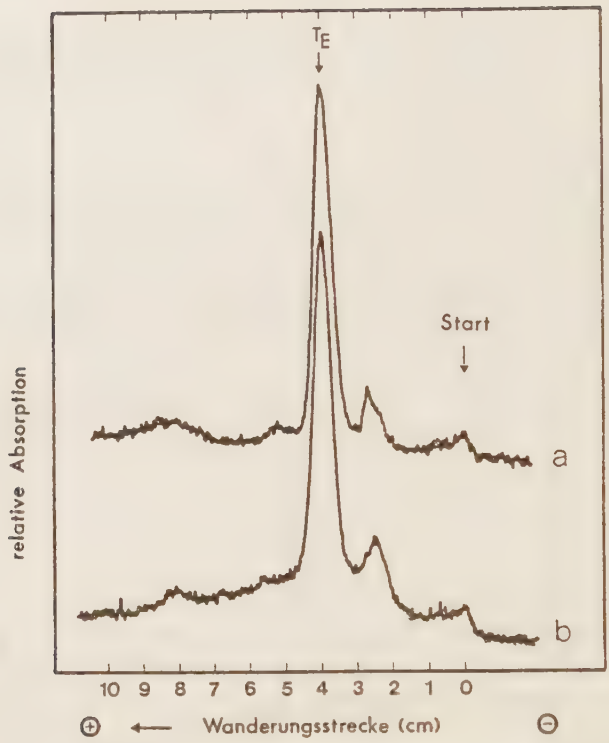


Fig. 28. Vergleich der Längen des Taq I/5-Transkripts ^{T}E und der spezifisch mit UpG initiierten RNA (Fig. 27.)

Die RNA-Analyse wurde durchgeführt wie in Methoden, Abschnitt 7.1., und in Legende zu Fig. 27. beschrieben.

a: Transkription von Fragment Taq I/5 in Gegenwart von UpG; zu den Versuchsbedingungen vgl. Legende zu Fig. 27.

b: Transkription von Fragment Taq I/5 im Standardsystem (Methoden, Abschnitt 4.)

---

zu Fig. 27.:

6.5 pmol M.luteus RNA Polymerase wurden im Testsystem (vgl. Methoden, Abschnitt 7.1.) bei Substratkonzentrationen von 10 µmol GTP/l und je 25 µmol/l ATP, CTP, [α-^{32}P]UTP in Gegenwart von 0.2 mmol Dinukleotid/l mit 1.6 pmol Restriktionsfragment Taq I/5 30 min bei 37°C inkubiert. Weiter wurde verfahren wie in Abschnitt D.5.2. bzw. Methoden, Abschnitt 1.3., beschrieben.

Die Stimulation der RNA-Synthese ist nicht auf Dinukleotide beschränkt, die das unter normalen Synthesebedingungen am 5'-Ende einer RNA eingebaute Nukleosid enthalten, sondern kann auch mit Dinukleotiden erzielt werden, die zu DNA-Abschnitten in der näheren Umgebung der RNA-Startstelle komplementär sind. Dabei werden diese Dinukleotide am 5'-Ende in die neusynthetisierte RNA inkorporiert (Downey et al., 1971; Minkley und Pribnow, 1973).

So beobachtet man einen ähnlichen Effekt wie mit UpG, wenn man das oben beschriebene Experiment mit dem Dinukleotid UpU ausführt (Fig. 29.). Die Spezifität der Wirkung von UpU belegt ein Kontrollversuch mit ApU (Fig. 29.).

Der Versuch, eine Stimulation der RNA-Synthese durch eines der Dinukleotide GpA, GpG, GpC oder GpU, bei denen sich das bei normalen Substratkonzentrationen initiierende Guanosin in 5'-Position befindet, zu erreichen, fiel erstaunlicherweise negativ aus (ohne Beleg). Vermutlich kommen hier Unterschiede in der Struktur der verschiedenen RNA Polymerasen zum Tragen, da die oben zitierten Autoren bei E.coli RNA Polymerase eine Stimulation der Synthese einzelner RNA-Spezies durch entsprechende Dinukleotide erreichen konnten.

Als Folgerung aus den geschilderten Experimenten ergibt sich, daß auch M.luteus RNA Polymerase wie das E.coli-Enzym grundsätzlich in der Lage ist, anstelle von Purintriphosphaten geeignete Dinukleotide zur RNA-Initiation zu nutzen.

Die stimulierende Wirkung der Dinukleotide UpU und UpG auf die limitierte Synthese des M.luteus-spezifischen Taq I/5-Transkripts legt eine Sequenz TpTpG auf dem viralen Plus-Strang im Startbereich dieses Transkripts nahe. In der Tat findet man diese Sequenz innerhalb des anhand von Transkriptlängen eingegrenzten DNA-Abschnitts (vgl. D.4.2.). Eine endgültige Bestätigung kann jedoch, in Anbetracht der hohen Fehlergrenze in der RNA-Längenbestimmung, nur die Sequenzanalyse des 5'-terminalen RNA-Bereichs erbringen.

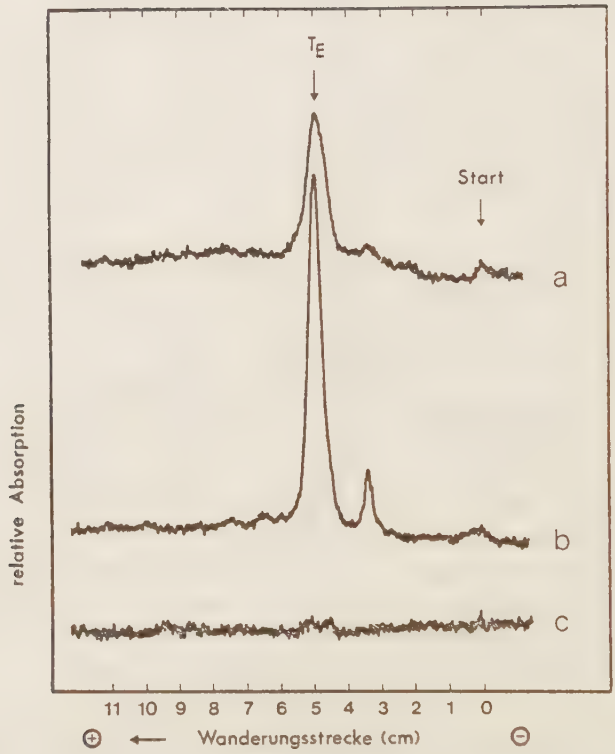


Fig. 29. Spezifische Initiation des Tag I/5-Transkripts T_E mit Dinukleotiden (UpU, ApU)

Zur Versuchsdurchführung vgl. Legende zu Fig. 27.

a: Transkription von Fragment Tag I/5 im Standardsystem (Methoden, Abschnitt 4.)

b: Transkription in Gegenwart von UpU

c: Transkription in Gegenwart von ApU

5.3. Sequenzierung des 5'-terminalen Bereichs der RNA $^{H}_{E}$

In den letzten Jahren wurden mehrere Methoden entwickelt, die durch basenspezifische Spaltung einer an einem Ende der Kette radioaktiv markierten RNA entweder auf chemischem Weg (Peattie, 1979) oder durch kontrollierten enzymatischen Abbau der RNA (Donis-Keller et al., 1977; Simoncsits et al., 1977) und anschließende Auftrennung der Spaltprodukte an hochauflösenden denaturierenden Polyacrylamidgelen eine rasche Sequenzierung von RNA ermöglichen (Zusammenfassung s. Domdey, 1980).

Diese Methoden sind jedoch mit Schwierigkeiten verbunden, wenn die Sequenz des 5'-Endes einer RNA bestimmt werden soll, da kurze Spaltstücke bis zu etwa 7 Nukleotiden Länge durch eindimensionale Gelelektrophorese oft nicht eindeutig analysiert werden können (H. Domdey, persönliche Mitteilung). Vorteilhafter ist hierzu die sog. "mobility shift"- oder "wandering spot"-Methode, die analog zur Sequenzierung kurzer DNA-Fragmente (Tu und Wu, 1980) auch auf Oligoribonukleotide bzw. 5'-terminale Regionen längerer RNAs anwendbar ist (Gillum et al., 1975; Gross et al., 1978). Es handelt sich dabei um eine zweidimensionale Auftrennung von Oligonukleotiden, die bei kontrolliertem Abbau einer 5'-^{32}P-markierten RNA durch eine basenunspezifische Nuklease oder durch partielle saure Hydrolyse entstehen. Nach Autoradiographie kann durch Vergleich der unterschiedlichen Mobilitäten der einzelnen 5'-markierten Abbauprodukte direkt die Nukleotidsequenz abgelesen werden.

Zur Sequenzanalyse des Hae III/7-Transkripts $^{H}_{E}$ wurde die Synthese der RNA in Gegenwart von γ-^{32}P-markiertem GTP durchgeführt, nicht inkorporiertes GTP gelelektrophoretisch abgetrennt und die RNA analog zu einer von Maxam und Gilbert (1977) beschriebenen Methode aus dem Gel eluiert.
Die Sequenzierung wurde nach einer weiteren Reinigung der RNA durch Gelelektrophorese von Herrn Dr. H. Domdey am Max-

Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, durchgeführt.

Die nach kontrollierter saurer RNA-Hydrolyse (Krupp und Gross, 1979) und Auftrennung der Spaltprodukte durch Hochspannungselektrophorese auf Celluloseacetat (1. Dimension) und Dünnschichtchromatographie an DEAE-Cellulose (2. Dimension) erhaltenen spots (Fig. 30.) wurden ausgewertet wie bei Domdey (1980) bzw. Tu und Wu (1980) beschrieben.

Die ungewöhnliche Mobilität des 5'-terminalen Guanosinnukleotids gegenüber dem nächstlängeren Abbauprodukt wird durch die starke negative Ladung der Triphosphatgruppe verursacht, die eine erhöhte Wanderungsgeschwindigkeit in der Hochspannungselektrophorese zur Folge hat. Demnach lautet die lesbare Sequenz der 5'-terminalen Nukleotide: pppGUAGGAUAC...

Der entsprechende Sequenzabschnitt auf dem nichtkodogenen DNA-Strang findet sich genau innerhalb des in Abschnitt D. 4.2. eingegrenzten Startbereichs der RNA ^{H}E. Damit ist das initiierende Guanosintriphosphat auf dem viralen Plus-Strang in Position 585, von der Pst I-Schnittstelle der zirkulären DNA aus gerechnet, 18 Basenpaare nach dem Start des Gens E, lokalisiert (vgl. Sanger et al., 1977).

Eine Übereinstimmung besteht auch hinsichtlich des Trinukleotids TpTpG, das durch spezifische Initiation der RNA-Synthese mit Dinukleotiden ermittelt wurde (vgl. Abschnitt D.5.2.). Da hierfür das DNA-Fragment Taq I/5 als Matrize verwendet worden war, bestätigt sich die Annahme, daß die an den Restriktionsfragmenten Hae III/7 und Taq I/5 abgelesenen spezifischen RNAs ^{H}E und ^{T}E an derselben Position auf dem Genom initiieren; die gleiche Aussage gilt vermutlich wohl auch für das Mbo II/7-Transkript ^{M}E.

Daß es sich tatsächlich, zumindest im Fall des Hae III/7-Transkripts ^{H}E, um "run off"-Produkte handelt, geht aus einer Sequenzanalyse hervor, die ebenfalls in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. H. Domdey durchgeführt wurde (Fig. 31.; vgl. dazu Krupp und Gross, 1979). Das Sequenzgel ermöglicht eine Festlegung der Positionen aller Guanosine auf der RNA ^{H}E bis

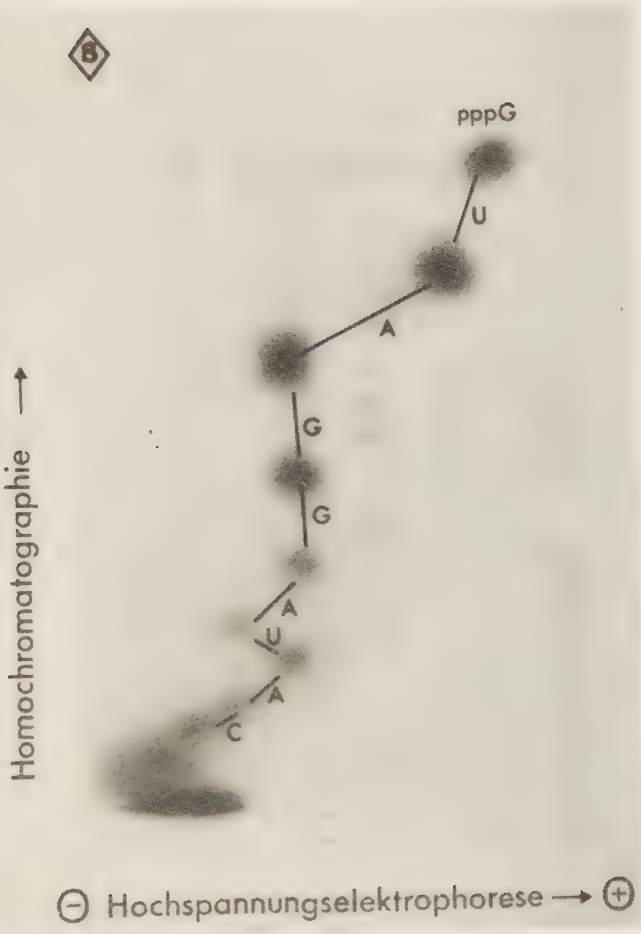


Fig. 30. Sequenzanalyse der 5'-terminalen Nukleotide des Hae III/7-Transkripts $^{H}_{E}$

Zweidimensionale Auftrennung eines partiellen Hydrolysates der γ-32P-markierten RNA $^{H}_{E}$ (vgl. Fig. 16. und Methoden, Abschnitt 7.2.) durch Hochspannungselektrophorese auf Celluloseacetat-Streifen (pH 3.5) und Homochromatographie an DEAE-Cellulose (s. Methoden, Abschnitt 7.3.). Ⓑ:Bromphenolblau Die lesbare Sequenz lautet: pppGUAGGAUAC...

zum 3'-Ende der RNA; eine Ablesung der übrigen Basen ist bis etwa 30 Nukleotide vor dem 3'-Terminus der RNA möglich.

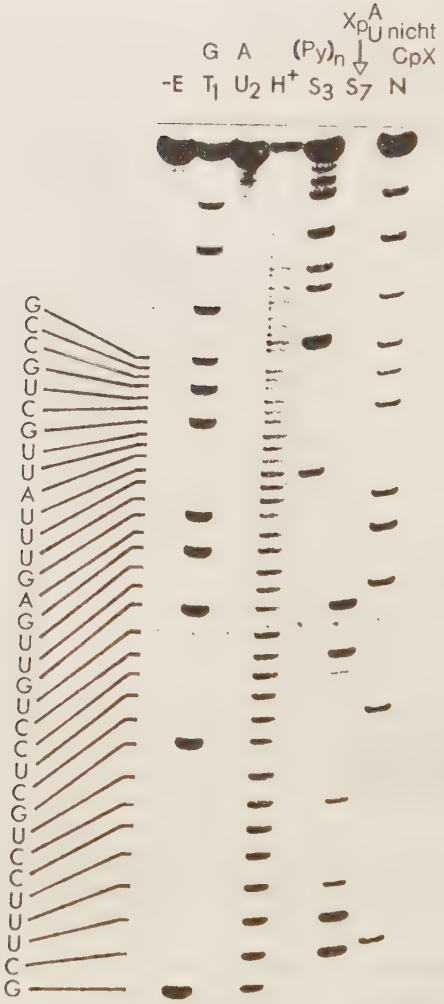


Fig. 31. Auftrennung verschiedener kontrollierter enzymatischer Spaltungen der γ-^{32}P-markierten RNA $^{H}_{E}$ (vgl. Fig. 16. und 30., Methoden, Abschnitt 1.4.)

Zu den Spezifitäten der Enzyme und den Spaltbedingungen s. Methoden, Abschnitt 7.4.

zu Fig. 31.:

-E : Kontrolle, Inkubation ohne Enzym
T_1 : Spaltung mit Ribonuklease T_1
U_2 : Spaltung mit Ribonuklease U_2
H^+ : partielle saure Hydrolyse
S_3 : Spaltung mit Staphylococcus aureus Nuklease bei pH 3.5
S_7 : Spaltung mit Staphylococcus aureus Nuklease bei pH 7.5
N : Spaltung mit Neurospora crassa Nuklease

E. Transkriptionsspezifität eines Enzym-Hybrids aus E.coli Core-Polymerase und M.luteus σ

Lill, Behrendt und Hartmann (1975) fanden, daß durch Hybridisierung von Untereinheiten der RNA Polymerasen aus E.coli und M.luteus katalytisch aktive Enzym-Hybride erzeugt werden können, obwohl sich die Untereinheiten der beiden Polymerase-Spezies in Primärstruktur und immunologischen Eigenschaften deutlich unterscheiden (vgl. Hartmann, 1976; Leib et al., 1980).
Aus diesem Befund und der hohen Speziesspezifität in der Transkription des Restriktionsfragments Hae III/7 durch M.luteus Holoenzym ergibt sich die Möglichkeit, zu untersuchen, ob einer der vier Untereinheiten α, β, β' oder σ, aus denen sich beide Enzyme zusammensetzen, bei der speziesspezifischen Transkription eine besondere Bedeutung zukommt.

Für die spezifische Promotorerkennung wird im allgemeinen die Untereinheit σ verantwortlich gemacht (Burgess et al., 1969). Daher liegt es nahe, das Verhalten eines Enzym-Hybrids aus E.coli Core-Polymerase und der Sigma-Untereinheit aus M.luteus Polymerase im Hinblick auf die Transkriptionsspezifität zu testen.

1. Stimulation der Transkriptionsaktivität von $^{e}_{core}$ durch $^{m}\sigma$

Die Untereinheit aus M.luteus RNA Polymerase stimuliert nicht nur die Aktivität des Core-Enzyms aus demselben Organismus, sondern auch der Core-Polymerase aus E.coli.
Je nach Präparation von M.luteus σ erreicht dieses heterologe Enzym 60 - 85 % der Aktivität, die bei Zusatz von E. coli σ zum homologen Core-Enzym gemessen wird (Lill et al., 1977).

Der Einfluß von M.luteus σ auf die Aktivität der E.coli Core-Polymerase drückt sich nicht nur in einer generell gesteigerten Syntheserate, sondern auch in der Spezifität der Ablesung aus (Ernst, 1978).

Bei Transkription des isolierten øX174-Restriktionsfragments HindII/4 (vgl. Abschnitt A.1.1.) zeichnet sich das Enzym-Hybrid durch eine äußerst stark ausgeprägte Präferenz in der Synthese einer RNA-Spezies aus, die gemäß den in Abschnitt A.1.1. beschriebenen Ergebnissen am Gen A-Promotor initiiert (Fig. 32.).
Dieser Promotor wird von den beiden parentalen Holo-Enzymen ebenfalls erkannt, sodaß weniger die Tatsache der Promotorerkennung durch das heterologe Enzym als vielmehr die außergewöhnlich hohe spezifische RNA-Syntheserate überrascht. Auffällig ist ferner, daß sämtliche RNA-Produkte der beiden Holoenzyme unter den Transkripten des Enzym-Hybrids vertreten sind. Das besagt, daß dieses Enzym-Hybrid aus E.coli Core-Polymerase und M.luteus σ in der Ablesespezifität Eigenschaften der parentalen Enzyme in sich vereint.

2. Transkription des Restriktionsfragments Hae III/7 durch das Enzym-Hybrid

Die Synthese einer RNA, die an einem von beiden Polymerase-Spezies erkannten Promotor initiiert, wird nicht unerwartet auch von einem Enzym katalysiert, das durch Austausch einer Untereinheit entsteht.
Von besonderem Interesse ist aber die Frage, wie sich dieses heterologe Enzym bei der Ablesung einer Matrize verhält, die einen Promotor trägt, an dem nur von einer der beiden parentalen Polymerase-Spezies eine klar nachweisbare RNA-Synthese gestartet wird.

Core-Polymerase aus E.coli ist ebenso wie das Holoenzym nicht in der Lage, an Restriktionsfragment Hae III/7 als Matrize

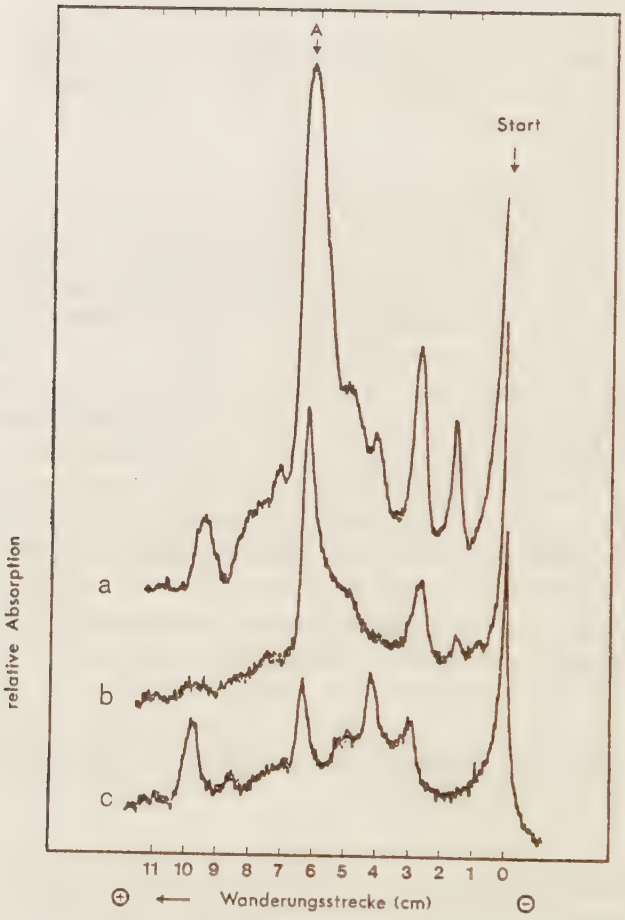


Fig. 32. Transkription des øX174-Restriktionsfragments HindII/4 durch das Enzym-Hybrid aus E.coli Core-Enzym und M.luteus σ

Der Transkriptionsansatz (Standardsystem: Methoden, Abschnitt 4.) enthielt 2.5 µg (32.9 pmol) M.luteus σ-Untereinheit und 2.5 µg (6.8 pmol) E.coli Core-Polymerase. Die Versuchsdurchführung erfolgte wie in Legende zu Fig. 4. beschrieben.

a: RNA-Synthese mit dem Enzym-Hybrid $^{e}_{core} + {}^{m}_{\sigma}$
b: RNA-Synthese mit Holo-Polymerase aus E.coli (6.5 pmol)
c: RNA-Synthese mit Holo-Polymerase aus M.luteus (6.5 pmol)

die Synthese einer spezifischen RNA zu katalysieren (Fig. 33.). Setzt man jedoch Sigma-Untereinheit aus M.luteus Polymerase zu, so wird die Synthese einer RNA-Spezies $H_{E'}$ becbachtet, die in der Länge identisch mit dem Transkript H_E ist, das spezifisch von M.luteus Holo-Polymerase an Fragment Hae III/7 abgelesen wird (Fig. 33.).

Fig. 33. Transkription des Restriktionsfragments Hae III/7 durch das Enzym-Hybrid $^{e}core + {}^{m}\sigma$

Die Transkriptionsbedingungen waren analog zu Fig. 32. Versuchsdurchführung und Gelelektrophorese erfolgten wie in Methoden, Abschnitte 4. und 1.3., beschrieben.

Die quantitative Auswertung des radioaktiven Einbaus an [α-^{32}P]UMP durch Čerenkov-Zählung ergibt, daß unter gleichen Bedingungen durch das Enzym-Hybrid etwa halb soviel spezifische RNA wie durch M.luteus Holoenzym synthetisiert wird (Tab. 3.). Der mit E.coli Core-Polymerase erhaltene Wert liegt nicht signifikant höher als der des radioaktiven Untergrunds im Gel (Tab. 3.); M.luteus σ allein zeigt keine Syntheseaktivität (ohne Beleg).

Enzym	Einbau von [α-^{32}P]UMP (Ipm)
^{e}core	56
^{e}core + $^{m}\sigma$	15000
^{m}holo	30650

Tab. 3. Vergleich der relativen Syntheseraten der Hae III/7-Transkripte ^{H}E und ^{H}E' durch M.luteus Holo-Polymerase bzw. das Enzym-Hybrid ^{e}core + $^{m}\sigma$

Zur Ermittlung der relativen RNA-Syntheseraten wurde verfahren wie in Legende zu Tab. 1. beschrieben.

---

zu Fig. 33.:

^{e}h: RNA-Synthese mit E.coli Holo-Polymerase (6.5 pmol)

^{m}h: RNA-Synthese mit M.luteus Holo-Polymerase (6.5 pmol)

^{e}c$^{m}\sigma$: RNA-Synthese mit dem Enzym-Hybrid ^{e}core + $^{m}\sigma$ (6.8 pmol Coreenzym, 32.9 pmol M.luteus σ)

^{e}c: RNA-Synthese mit E.coli Core-Polymerase (6.8 pmol)

^{H}E': Durch ^{e}core + $^{m}\sigma$ synthetisierte RNA mit gleicher Mobilität in der Elektrophorese wie ^{H}E (Fig. 16.)

3. Kompetition zwischen $^{e}\sigma$ und $^{m}\sigma$

Die funktionelle Äquivalenz der σ-Untereinheiten aus E.coli und M.luteus wird von Lill et al. (1977) aufgrund zweier Effekte postuliert: Zum einen kann M.luteus σ, wie schon erwähnt, die Transkriptionsaktivität von E.coli Coreenzym stark stimulieren; zum andern wird das Aggregationsverhalten von E.coli Coreenzym-Protomeren durch die beiden σ-Untereinheiten in ähnlicher Weise beeinflußt.
Setzt man voraus, daß E.coli Core-Polymerase die homologe σ-Untereinheit stärker bindet als die σ-Untereinheit aus M.luteus, so sollte in Konsequenz zu den obigen Befunden die im vorausgegangenen Abschnitt beschriebene spezifische Ablesung des Restriktionsfragments Hae III/7 durch das Enzym-Hybrid in Gegenwart von E.coli σ weitgehend unterdrückt werden.

Zur Klärung dieser Frage wurden im Transkriptionssystem M.luteus σ und die dreifache Menge an E.coli σ zusammen mit Fragment Hae III/7 vorgelegt und die Reaktion durch Zugabe von E.coli Coreenzym gestartet. Während 30-minutiger Inkubation werden dabei weniger als 10 % der Menge an spezifischer RNA $^{H}_{E'}$ synthetisiert wie unter gleichen Bedingungen in Abwesenheit von E.coli σ (Fig. 34.).

Die Untereinheiten σ aus E.coli und M.luteus können demnach miteinander um die Bindung an E.coli Core-Polymerase konkurrieren und ihren Einfluß in der Promotorerkennung geltend machen. Da die Kontaktstellen der Untereinheiten von RNA Polymerasen aus verschiedenen Eubakterien im Laufe der Evolution mehr erhalten wurden als äußere Bereiche und daher die Untereinheiten immunologisch näher verwandt sind als die Holo-Polymerasen (Leib, 1979), kann man annehmen, daß E.coli- und M.luteus-σ an derselben Stelle auf E.coli Coreenzym gebunden werden.

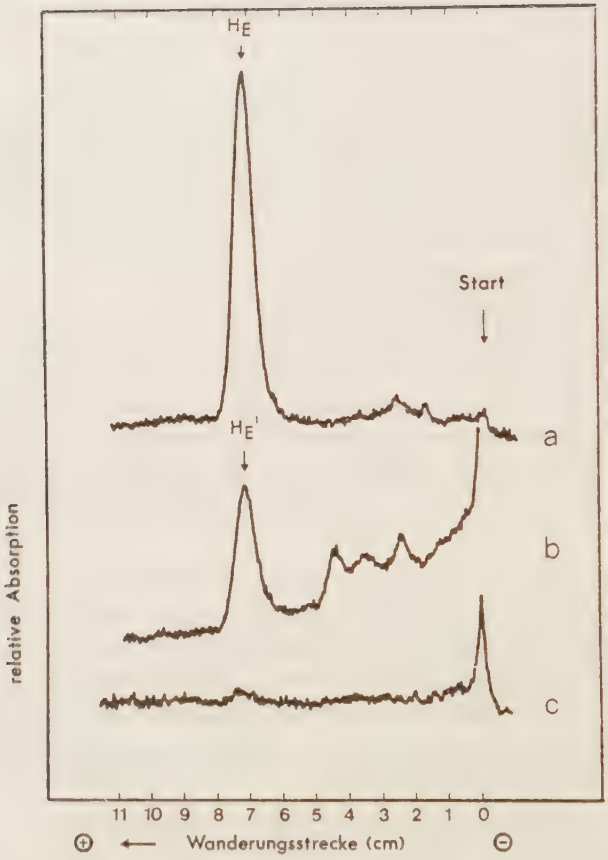


Fig. 34. Unterdrückung der Synthese des Transkripts $^{H}E'$ durch σ-Untereinheit aus E.coli

Zur RNA-Synthese wurde neben den restlichen Testkomponenten (Methoden, Abschnitt 4.) und dem DNA-Fragment Hae III/7 33 pmol M.luteus σ allein (b) bzw. zusammen mit 100 pmol E.coli σ (c) bei 0°C vorgelegt und nach Zugabe von 6.8 pmol E.coli Coreenzym durch Erhöhung der Temperatur auf 37°C die Reaktion gestartet. Weiter wurde verfahren, wie in Methoden, Abschnitte 4. und 1.3., beschrieben.

a: RNA-Synthese durch M.luteus Holo-Polymerase (vgl. Fig. 16.)
b: RNA-Synthese durch das Enzym-Hybrid ^{e}core + $^{m}\sigma$ (vgl. Fig. 33.)
c: RNA-Synthese in Gegenwart von $^{e}\sigma$, $^{m}\sigma$ und ^{e}core

4. Nachweis der Identität der spezifischen Hae III/7-Transkripte mit M.luteus Holo-Polymerase und dem Enzym-Hybrid aus E.coli Coreenzym und M.luteus σ

Die Tatsache, daß die zwei RNA-Spezies ^{H}E und $^{H}E'$, die durch M.luteus Holo-Polymerase bzw. das Hybrid aus E.coli Coreenzym und M.luteus σ an Fragment Hae III/7 abgelesen werden, in ihrer elektrophoretischen Mobilität innerhalb der Auflösungsgrenzen des Gels übereinstimmen, besagt noch nicht, daß die beiden Transkripte identisch sind. Es wäre z.B. denkbar, daß topologische Unterschiede in der Enzym-DNA-Wechselwirkung zu einer geringfügigen Verschiebung der RNA-Startposition führen, was bei der Gelelektrophorese nicht mehr erkannt werden kann. Ein anderer Einwand besteht darin, daß Initiations- und Terminationsorte der beiden RNAs um etwa den gleichen Betrag in derselben Richtung gegeneinander verschoben sein könnten.
Gelingt aber der Nachweis, daß die zwei RNAs an derselben Stelle auf der DNA initiieren, bleibt nur noch die Möglichkeit einer um wenige Nukleotide früheren Termination der RNA-Synthese durch das Enzym-Hybrid offen.

4.1. Vergleich der Startnukleotide

Einen ersten Hinweis auf eine Übereinstimmung der RNAs in den 5'-Enden kann die Bestimmung des Startnukleotids geben. In Abschnitt D.5.1. wurde mit Hilfe von γ-^{32}P-markierten Nukleosidtriphosphaten gezeigt, daß die Synthese der RNA ^{H}E durch M.luteus Polymerase mit einem Guanosintriphosphat gestartet wird. Führt man den Versuch analog mit dem Enzym-Hybrid aus, findet man ebenfalls einen Einbau von [γ-^{32}P]-GTP in das betreffende RNA-Produkt $^{H}E'$ (Fig. 35.).

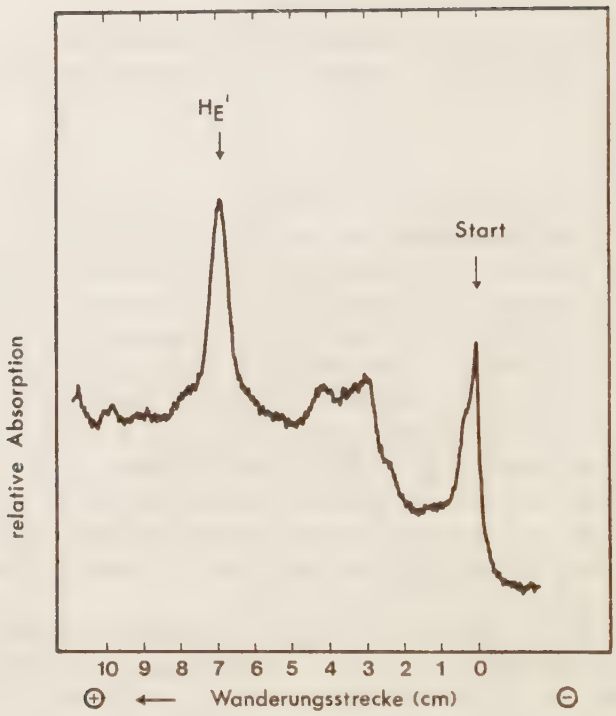


Fig. 35. Bestimmung des Startnukleotids der RNA $^{H}E'$

Die RNA-Synthese wurde mit 2.5 µg (6.8 pmol) E.coli Core-Polymerase und 2.5 µg (32.9 pmol) M.luteus σ in Gegenwart von [γ-^{32}P] GTP durchgeführt wie in Legende zu Fig. 24.a. beschrieben.

4.2. Spezifische Initiation mit Dinukleotiden

Die Gemeinsamkeit der RNAs ^{H}E und $^{H}E'$ im Startnukleotid Guanosintriphosphat erlaubt nun die Frage, ob auch das Enzym-Hybrid mit den Dinukleotiden UpU und UpG an Stelle des initiierenden Nukleosidtriphosphats spezifisch die Synthese eines Taq I/5-Transkripts $^{T}E'$ zu initiieren vermag, wie das bei der Synthese der RNA ^{T}E durch M.luteus Holo-Polymerase

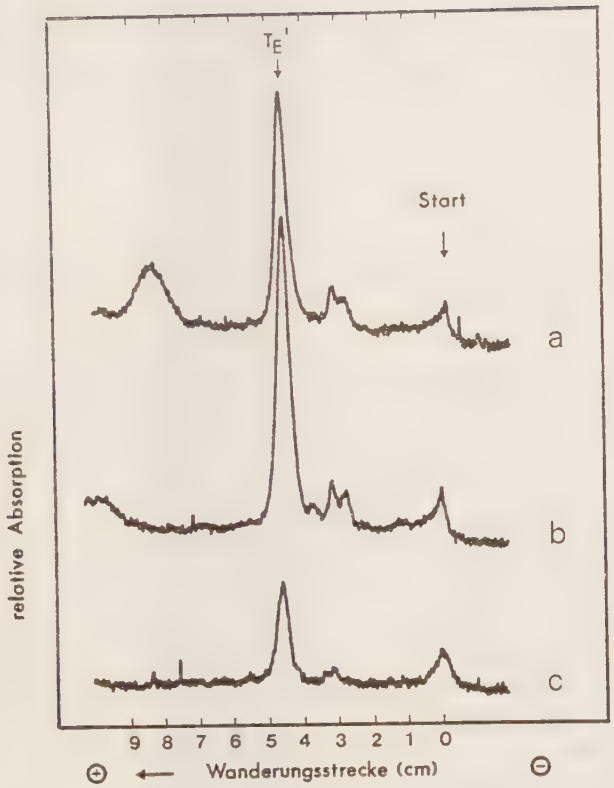


Fig. 36. Spezifische Initiation des Taq I/5-Transkripts $T_{E'}$ mit Dinukleotiden (UpG, UpU)

Die RNA-Synthese wurde mit 2.5 µg (6.8 pmol) E.coli Core-Polymerase und 2.5 µg (32.9 pmol) M.luteus in Gegenwart von 0.2 mmol Dinukleotid/l (a: UpG; b: UpU) bei limitierenden Substratkonzentrationen durchgeführt wie in Legende zu Fig. 27. beschrieben.

a: RNA-Synthese in Gegenwart von UpG
b: RNA-Synthese in Gegenwart von UpU
c: Vergleich: RNA-Synthese ohne Dinukleotid; die Konzentration an GTP war im Unterschied zu Fig. 27. und zu Methoden, Abschnitt 7.1., auf 25 µmol GTP/l erhöht.

der Fall ist (Abschnitt D.5.2.).

Tatsächlich ist es möglich, die bei niedriger GTP-Konzentration im Transkriptionssystem reduzierte spezifische RNA-Synthese durch das Enzym-Hybrid mit dem Dinukleotid UpG und, sogar in noch höherem Ausmaß, auch mit UpU zu stimulieren (Fig. 36.).

4.3. Vergleich eines partiellen RNase-Abbaus der 5'-markierten RNAs

Ein endgültiger Beweis, daß die 5'-Enden zweier RNA-Spezies identisch sind, kann durch partiellen Abbau der am 5'-Ende radioaktiv markierten RNAs mit einer basenspezifischen Nuklease und anschließenden Vergleich der Spaltprodukte erbracht werden. Stimmen die Spaltungsmuster in mehr als zwei spezifisch erzeugten, markierten RNA-Fragmenten überein, so kann es als sicher betrachtet werden, daß die Synthese der beiden RNAs an derselben DNA-Position startet. Es ist zwar vorstellbar, daß aufgrund einer ganz bestimmten Basenverteilung diese Überlegung nicht zutrifft, doch kann man einen solchen Fall anhand der bekannten Nukleotidsequenz der Matrize leicht ausschließen.

Es wurde daher das DNA-Fragment Hae III/7 parallel durch M.luteus Holo-Polymerase bzw. durch das Enzym-Hybrid aus E.coli Coreenzym und M.luteus σ in Gegenwart von [γ-^{32}P]GTP transkribiert; die erzeugten Produkte wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und die radioaktiv markierten RNAs aus dem Gel eluiert (vgl. Abschnitt D.5.3.).
Nach anschließender kontrollierter Partialspaltung der RNAs mit der Guanosin-spezifischen RNase T_1 wurden die 5'-markierten Fragmente in einem 15 %igen denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt (Fig. 37.).

Zunächst kann man festhalten, daß die Hauptprodukte der Spaltung bei beiden RNAs dieselben sind. Damit ist klar,

Fig. 37. Vergleich der Spaltprodukte der Transkripte ^{H}E und $^{H}E'$ nach kontrolliertem Abbau durch Ribonuklease T_1

Synthese und Isolierung der γ-^{32}P-markierten RNAs ^{H}E und $^{H}E'$ erfolgten wie in Methoden, Abschnitt 7.2., erläutert. Die Bedingungen für T_1-Partialspaltung und Auftrennung der RNA-Fragmente auf einem Sequenzgel sind in Methoden, Abschnitte 7.2. und 1.4. angegeben.

$e_c m_\sigma$: RNA-Synthese durch das Enzym-Hybrid ^{e}core + $^{m}\sigma$
m_h : RNA-Synthese durch M.luteus Holo-Polymerase

daß das Enzym-Hybrid und M.luteus Holo-Polymerase den gleichen RNA-Initiationsort auf der DNA-Matrize erkennen.

Daneben fällt vor allem die große Zahl an RNA-Spaltstücken auf, die eine eindeutige Zuordnung der RNA-Fragmente zu Abschnitten auf der DNA-Matrize und damit auch einen Vergleich der in Fig. 37. und Fig. 31. gezeigten Gele verhindern. Die einfachste Erklärung für diesen Befund wäre die Annahme einer Verunreinigung mit einer unspezifischen Nuklease. Man muß allerdings auch die Möglichkeit in Betracht ziehen, daß die zur T_1-Spaltung aus dem Gel isolierte 5'-markierte RNA nicht einheitlich war, sondern einen geringen Anteil an Transkripten enthielt, deren Synthese an anderer Stelle auf der Matrize gestartet wird [3]. Sehr viel wahrscheinlicher ist aber, daß man es hier mit einem Artefakt bei der RNA-Spaltung bzw. der Gelelektrophorese zu tun hat. So ist bekannt (vgl. z.B. EMBO Course - in situ hybridisation, Department of Genetics, University of Edinburgh, September 16-30 1978, Kap. C.4.), daß die elektrophoretische Mobilität von DNA- oder RNA-Fragmenten im Gel durch den hier verwendeten Tris-Borat-Puffer (Methoden, Abschnitt 7.2.), vermutlich aufgrund einer Wechselwirkung zwischen Borat und Ribose, beeinflußt wird. Als Artefakte sind wahrscheinlich auch die intensiven Banden von Abbauprodukten zu betrachten, die nur wenig in das Gel eingewandert sind und auf deren weitere Analyse verzichtet wurde.

---

[3] Eine derartige Vorstellung kann anhand des vorliegenden Versuchsergebnisses zwar nicht völlig ausgeschlossen werden, doch wird der Spielraum für eine solche Variabilität in der Initiation durch die geringe Längendifferenz, innerhalb der sich die aus dem Gel isolierten Transkripte bewegen, erheblich eingeschränkt. Eine notwendige Bedingung für eine solche Erklärung wäre ferner, daß alle Spaltprodukte der einheitlichen RNA-Spezies von Spaltprodukten der an anderen Stellen auf der DNA initiierten RNAs als Satelliten begleitet werden. Eine solche Periodizität bei den RNA-Fragmenten ist allerdings in dem in Fig. 37. gezeigten Gel nicht erkennbar.

Diskussion

Die RNA Polymerase aus dem grampositiven Bakterium Micrococcus luteus katalysiert an der RF DNA des Bakteriophagen øX174 als Matrize die Synthese definierter RNA-Produkte. Der Vergleich mit der RNA Polymerase aus E.coli ergibt, daß M.luteus Polymerase in der Lage ist, an den drei øX174-Promotoren A, B und D (vgl. Sanger et al., 1977, 1978) spezifische RNAs zu initiieren.

Gemeinsamkeiten von RNA Polymerasen aus phylogenetisch verschiedenen Bakterien-Spezies in Promotor- und Terminatorerkennung wurden auch von Wiggs et al. (1979) beobachtet. Die Transkription der DNA einer Deletionsmutante des Coliphagen T7, bei der die Expression der frühen Gene von den Promotoren A_1, C, D und E sowie einem Rho-unabhängigen Terminator kontrolliert wird, durch die gereinigten RNA Polymerasen aus E.coli, Bacillus subtilis, Caulobacter crescentus, Azotobacter vinelandii, Rhodospirillum rubrum, Mycobacterium smegmatis und Lactobacillus curvatus liefert bei der gelelektrophoretischen Analyse der Transkripte qualitativ übereinstimmende RNA-Produktmuster; die Effizienzen der Initiation an den einzelnen Promotoren variieren bei den verschiedenen Polymerase-Spezies allerdings deutlich.

Die Grundlage für eine gemeinsame Erkennung von DNA-Signalsequenzen ist eine Ähnlichkeit der verschiedenen Polymerasen in den katalytischen Zentren, etwa in den Ladungsmustern oder der räumlichen Faltung der Polypeptidketten.
Aus peptidchemischen und immunologischen Untersuchungen von Leib (1979) geht zwar hervor, daß die RNA Polymerasen aus E.coli und M.luteus keine große Übereinstimmung in der Pri-

märstruktur der einzelnen Untereinheiten aufweisen und auch nur eine sehr geringe immunologische Verwandtschaft zwischen den beiden Enzymen besteht, doch ist es wahrscheinlich, daß das aktive Zentrum in erster Linie in seiner räumlichen Struktur im Laufe der Evolution besonders gut konserviert wurde. So können z.B. schon relativ kleine Konzentrationen an Antikörpern gegen E.coli RNA Polymerase die Aktivität des M.luteus-Enzyms partiell inhibieren (Leib, 1979). Weitere Hinweise, die für diese Vorstellung sprechen, sind Analogien im Ablauf des RNA-Initiationsprozesses bei beiden Polymerasen, z.B. die Möglichkeit einer spezifischen Initiation mit Oligonukleotiden (vgl. Abschnitt D.5.2.), oder in der Wirkungsweise des Antibiotikums Rifampicin (Lechner, 1980).

Promotoren der E.coli RNA Polymerase sind, wie aus einem Vergleich der DNA-Sequenzen zahlreicher RNA-Initiationsregionen hervorgeht, durch ein gewisses Maß an Sequenzhomologie in zwei DNA-Abschnitten charakterisiert: in der sogenannten "Pribnow box", einer AT-reichen Hexanukleotidsequenz (Pribnow, 1975; Schaller et al., 1975), und der -35-Region oder "recognition site" mit einer generalisierten Sequenz TTGACA (Gilbert, 1976; Siebenlist, 1979a); die beiden Sequenzabschnitte sind ungefähr 10 bzw. 35 Basenpaare vor der RNA-Startpostion lokalisiert. Durch Identifizierung der Kontaktstellen zwischen Promotor-DNA und E.coli RNA Polymerase an zwei verschiedenen Promotoren, dem lac UV5 Promotor und dem Promotor A_3 des Phagen T7, konnten Siebenlist et al. (1980) zeigen, daß in der Tat die Interaktion zwischen Enzym und Promotor gleichermaßen in beiden Fällen hauptsächlich in den DNA-Regionen -35 und -16 ebenso wie innerhalb der "Pribnow box" stattfindet. Die Kontaktstellen liegen dabei fast vollständig auf einer Seite des DNA-Moleküls.
Darüber hinaus gibt es auch genetische Evidenz: der überwiegende Teil der bisher untersuchten Promotor-Punktmutationen betrifft Basen aus den beiden genannten DNA-Bereichen (eine zusammenfassende Übersicht geben Rosenberg und Court,

1979; Bujard, 1980).
Die charakteristischen Strukturmerkmale eines Promotors der E.coli RNA Polymerase findet man auch bei den øX174-Promotoren A, B und D (Fig. 38.).

-35	-15	+1	
CGTCAGGATTGACACCCTCC	CAATTGTATGTTTTCATGC	CTCCA	^{e}A
TTCTCTTGTTGACATTTTAAA	AGAGCGTGGATTACTATCT	GAGTCC	^{e}D
TAAATAGCTTGCAAAATACGT	GGCCTTATGGTTACAGTA	TGCCCA	^{e}B
TTGACA	TATAAT		

Fig. 38. Sequenzen der Promotoren ^{e}A, ^{e}D und ^{e}B von E.coli RNA Polymerase auf øX174 RF DNA

Fünf der sechs Basenpaare innerhalb der "Pribnow box" der Promotoren A und D sind AT-Paare, und auch die -35-Regionen beider Promotoren stimmen in der für diesen Bereich typischen Sequenz TTGACA überein.
Der Promotor B enthält in der -35-Region ebenfalls die offenbar hochkonservierte Sequenz TTG, während die "Pribnow box" hier nur 4 AT-Paare aufweist.
Insgesamt betrachtet besteht eine relativ große Variationsbreite, was die einzelnen Basen in den Promotorregionen betrifft; eine Zusammenstellung von 54 bisher sequenzierten Promotoren zeigt, daß nur eine einzige Base, ein Thymin innerhalb der "Pribnow box", in allen Promotoren identisch ist

(Siebenlist et al., 1980). Der Vergleich von Promotorstrukturen wird zusätzlich dadurch erschwert, daß offensichtlich auch die Distanzen zwischen RNA-Startposition, "Pribnow box" und -35-Region variabel sind.
Die unterschiedlichen Eigenschaften und Effizienzen der verschiedenen Promotoren lassen allerdings von vornherein einen gewissen Grad an Variabilität in den Basensequenzen erwarten. Es scheint somit, daß die Summe von einzelnen, unabhängigen DNA-Strukturelementen, zu denen vermutlich auch die Lage der nur grob definierbaren Basensequenzmuster in exponierten Bereichen der DNA-Doppelhelix zählt, einen Promotor auszeichnet.

Die Existenz gemeinsamer Elemente verschiedener RNA Polymerasen in der Promotorerkennung deutet darauf hin, daß sich die Grundstruktur eubakterieller Promotoren in der Evolution nur wenig verändert hat. So ist z.B. ein "früher" Promotor auf dem Genom des Bacillus subtilis-Phagen SP01 in den Sequenzen der -35-Region wie der "Pribnow box" nahezu identisch mit dem durchschnittlichen E.coli-Promotor (Talkington und Pero, 1979); in der Tat bindet auch E.coli RNA Polymerase an diesen Promotor und initiiert an derselben Stelle wie B.subtilis Polymerase die Transkription einer spezifischen RNA (Lee et al., 1980).

Dennoch muß es Faktoren in der Enzym-Promotor-Wechselwirkung geben, die eine heterospezifische Transkription limitieren. Diese Schlußfolgerung ergibt sich aus der hohen Spezifität, mit der die RNA Polymerase aus M.luteus gegenüber E.coli Polymerase an einem definierten Promotor (^{m}E) auf øX174 RF DNA RNA-Synthese initiiert.
Speziesspezifitäten verschiedener RNA Polymerasen in der Ablesung derselben DNA-Matrize in vitro werden von mehreren Autoren berichtet. Iida et al. (1978) fanden Unterschiede bei der Analyse der Transkripte von fd RFI DNA durch die RNA Polymerasen aus E.coli und Caulobacter crescentus.
Ein weiteres Beispiel wird von Davison et al. (1980) angegeben: die Transkription von ø29 DNA mit E.coli RNA Poly-

merase ergibt drei RNA-Produkte, die mit Bacillus subtilis RNA Polymerase unter denselben Reaktionsbedingungen nicht nachgewiesen werden können.

Differenzen in Polymerase-Promotor-Wechselwirkungen können auf einer unterschiedlichen Sensitivität der Komponenten gegen die im Testsystem herrschende Ionenstärke beruhen. Die Transkription von T4 und T7 Phagen DNA durch B.subtilis RNA Polymerase z.B. wird bei 0.16 mol KCl/l zu 90 % gehemmt, während die Transkription verschiedener B.subtilis Phagen-DNAs durch Veränderungen in der Salzkonzentration kaum beeinflußt wird (Davison et al., 1979).
Im Falle der M.luteus-spezifischen Transkription läßt eine Variation der Salzbedingungen im Konzentrationsbereich zwischen 0.05 und 0.2 mol KCl/l allerdings keinen Einfluß auf die Speziesspezifität der Ablesung erkennen; vielmehr scheint das Salzoptimum für spezifische Transkription bei den RNA Polymerasen aus M.luteus und E.coli übereinstimmend im Bereich von 0.15 mol KCl/l zu liegen. Smith und Sinsheimer (1976) erhielten bei der Transkription von øX174 RFI DNA durch E.coli RNA Polymerase ebenfalls keinen Hinweis auf die Existenz von Promotoren, die nur bei niedriger Salzkonzentration wirksam sind.

Die Rate, mit der an einem Promotor RNA-Initiation stattfindet, hängt neben spezifischen Reaktionsbedingungen von der Struktur der RNA Polymerase einerseits und zum anderen von der Nukleotidsequenz des Promotors ab.
Aufgrund der Gemeinsamkeiten der RNA Polymerasen aus E.coli und M.luteus in der Erkennung der øX174-Promotoren A, B und D ist nicht zu erwarten, daß der øX174-Promotor ^{m}E, trotz einer 80 - 100-fach höheren RNA-Initiationsrate durch M.luteus Polymerase verglichen mit dem E.coli-Enzym, in den essentiellen Bereichen ein grundlegend anderes Basensequenzmuster als die genannten Promotoren besitzt. Vergleicht man die Nukleotidsequenz des DNA-Abschnitts, der der Startstelle der M.luteus-spezifischen RNA vorausgeht, mit den Sequenzen der Promotoren A, B und D, findet

man durchaus Übereinstimmungen von Basen in Positionen, die als wichtig für die Funktion eines Promotors der E.coli RNA Polymerase bezeichnet werden (Fig. 39.).

	RECOG-NITION SITE	PRIBNOW-SCHALLER BOX		"CONSENSUS SEQUENCE"
	TTGACA	TATAAT		
AT (MOLE %)	0.67	0.83		
	CGTCAGGATTGACACCCTCC	CAATTGTATGTTTTCATGC	CTCCA	^{e}A-PROMOTER
AT (MOLE %)	0.60	0.64		
AT (MOLE %)	0.67	0.83		
	TTCTCTTGTTGACATTTTAAA	AGAGCGTGGATTACTATCT	GAGTCC	^{e}D-PROMOTER
AT (MOLE %)	0.60	0.57		
AT (MOLE %)	0.67	0.67		
	TAAATAGCTTGCAAAATACGT	GGCCTTATGGTTACAGTA	TGCCCA	^{e}B-PROMOTER
AT (MOLE %)	0.60	0.71		
AT (MOLE %)	0.33	0.50		
	GCTCGTCGC TGCGTTGAGGCT	TGCGTTTATGG TACGCTGG	ACTTTG	^{m}E-PROMOTER
AT (MOLE %)	0.33	0.50		
	-35	-15	+1	

Fig. 39. Sequenzen der Promotoren ^{e}A, ^{e}D und ^{e}B von E.coli RNA Polymerase und des spezifisch von M.luteus RNA Polymerase erkannten Promotors ^{m}E auf øX174 RF DNA

Die DNA-Sequenzen sind entnommen aus Sanger et al. (1978).

Charakteristisch sind, vom Startnukleotid als +1 aus gezählt, einige Basen im Bereich zwischen den Positionen -8 und -13: Der Promotor A deckt sich in dem betreffenden Sequenzbereich in den beiden Thyminen, die die "Pribnow box" dieses Promotors begrenzen, mit dem Promotor ^{m}E; in den

Promotoren B und D jedoch findet man übereinstimmend mit ^{m}E die Trinukleotidsequenz TAC sowie ein weiteres Thymin an entsprechenden Stellen. Die Hexanukleotidsequenz TACGCT im Promotor ^{m}E kann somit als Analogon zur bekannten "Pribnow box" betrachtet werden.
Bemerkenswert ist weiter die Identität der Promotoren B und ^{m}E im Sequenzbereich zwischen den Nukleotidpositionen -13 und -19. Dies ist deswegen von besonderem Interesse, da Siebenlist et al. (1980) in Ethylierungs- und Methylierungsinterferenz-Experimenten gerade in diesem Sequenzabschnitt zahlreiche Kontaktstellen zwischen E.coli RNA Polymerase und Promotor-DNA, allerdings vorwiegend in den Phosphatgruppen, ermittelten.
Weniger ausgeprägt sind die Homologien in der -35-Region; hier ist die in allen drei øX174-Promotoren vertretene Trinukleotidsequenz TTG im Promotor ^{m}E auf die Sequenz TG reduziert.

Worin könnte demnach die Ursache dafür liegen, daß die RNA-Polymerase aus E.coli am Promotor ^{m}E nur in nicht mehr nachweisbarem Umfang RNA initiiert, und wodurch unterscheiden sich folglich die Polymerasen aus E.coli und M.luteus in der Wechselwirkung mit Promotoren?

Zunächst soll auf zwei Punkte, die bereits kurz angeklungen sind, näher eingegangen werden:

1) Die der "Pribnow box" analoge Sequenz TACGCT im Promotor ^{m}E besteht zur Hälfte aus den Basen G und C. Keiner der bisher sequenzierten Promotoren der E.coli RNA Polymerase enthält innerhalb der "Pribnow box" in einem Strang mehr als insgesamt zwei von den Basen G oder C (vgl. Siebenlist et al., 1980). Es ist denkbar, daß das zentrale Triplett CGC aufgrund der hoeheren thermodynamischen Stabilität von GC-Basenpaaren gegenüber AT-Paaren den Vorgang des Aufschmelzens der DNA-Doppelhelix negativ beeinflußt. Dieser Teilprozeß der RNA-Initiation wurde zuerst von Walter et al. (1967) postuliert; Siebenlist (1979) konnte

am A_3 Promotor der T7 Phagen DNA demonstrieren, daß im stabilen Komplex aus Promotor-DNA und E.coli RNA-Polymerase ein DNA-Sequenzabschnitt von 11 oder 12 Nukleotiden, der von der Mitte der "Pribnow box" (Position -9) bis kurz nach der RNA-Startstelle (Position +2) reicht, als Einzelstrang vorliegt. Unter der Annahme, daß das Aufschmelzen der DNA innerhalb der "Pribnow box" beginnt, kann sich aufgrund der Kooperativität des Prozesses die Anwesenheit der Trinukleotidsequenz CGC entscheidend auf die RNA-Initiationsrate auswirken. Als Beispiel für den Einfluß eines G - A -Austausches sei der Übergang von der lac-Promotor Wildtyp-Sequenz TATGTT in der -10-Region zur p^S-Mutation (TATATT) erwähnt, der einen 10-fachen Anstieg der lac-Expression bewirkt (Gilbert, 1976).
Für die Effizienz eines Promotors spielt aber sicherlich nicht nur die Stabilität der Helix, sondern auch die Basenspezifität in der Polymerase-Promotor-Interaktion eine entscheidende Rolle, worin die RNA-Polymerase aus M.luteus hinsichtlich einzelner Basen womöglich von der E.coli Polymerase abweicht.

2) Der DNA-Sequenzbereich zwischen den Positionen -30 und -40, gewöhnlich als -35-Region oder "recognition site" bezeichnet, ist in den Promotoren lac UV5 und T7 A_3 durch eine große Anzahl von RNA Polymerase-Kontakten gekennzeichnet (Siebenlist et al.,1980). Die RNA-Initiationsrate an einem E.coli-Promotor hängt empfindlich von bestimmten Basen in dieser Region ab. Eine Mutation im lac I Gen - Promotor etwa, die die Sequenz GCG in die Sequenz GTG im Bereich der prototypischen Sequenz TTG (vgl. oben) überführt, hat eine zehnfach erhöhte Promotoraktivität zur Folge (Calos, 1978).
Betrachtet man den betreffenden Sequenzabschnitt im Promotor ^mE und vergleicht dessen Sequenz mit den

Sequenzen der øX174-Promotoren A, B und D, so stellt man fest, daß allen Promotoren nur die schon erwähnte Dinukleotidsequenz TG gemeinsam ist. Auch hier zeigt der Promotor B eine geringfügig höhere Homologie zu Promotor ^{m}E: in beiden Fällen folgt der Sequenz TG ein C. Darüber hinaus ist keine signifikante Übereinstimmung in den Sequenzen der -35-Regionen der vier Promotoren zu beobachten. Um eine Ähnlichkeit des Promotors ^{m}E mit einem Promotor der E.coli Polymerase innerhalb des Bereiches maximaler Sequenzhomologie zu erreichen, ist ein Übergang von mindestens zwei Basen (CTGCGT geht über in TTGCAT, vgl. øX174 B) erforderlich.

Ob auch das Basenmuster in der Umgebung der -35-Region von Bedeutung ist, ist nicht klar; in diesen Bereichen ist die Variabilität der Basen, auch bezüglich des (A+T)/(G+C)-Verhältnisses, sehr hoch. Auffällig ist dennoch, daß im Vergleich zu den Promotoren A, B und D bei Promotor ^{m}E in dieser Region die GC-Paare deutlich überrepräsentiert sind (vgl. Fig. 39.). Um aber über den Einfluß einzelner Basen auf die Promotor-Wirkung entscheiden zu können, wäre eine quantitative Bestimmung der "Promotorstärken" in Abhängigkeit von Punktmutationen notwendig.

Man könnte nun einwenden, daß die jeweilige Lage der Kontaktregionen bezüglich des RNA-Startpunkts bei M.luteus RNA Polymerase gegenüber dem E.coli-Enzym verschoben ist, sodaß ein Vergleich der DNA-Sequenzen ein falsches Bild ergibt. Dagegen spricht neben der Übereinstimmung der beiden Polymerasen in der Erkennung der øX174-Promotoren A, B und D ein Befund, der in Abschnitt D.4.2. beschrieben wurde. RNA-Initiationsstudien von Schaller et al. (1975) ergaben, daß RNA Polymerase aus E.coli nicht in der Lage ist, neu an gereinigte DNA-Fragmente zu binden, die durch die Bildung eines stabilen Komplexes mit RNA Polymerase gegen Abbau durch DNase I geschützt wurden. Der undissoziierte Komplex kann allerdings sehr wohl in Anwesenheit von Substrat

die Synthese eines kurzen "run off"-Transkripts katalysieren. Des weiteren wird der Promotor p_R des Bakteriophagen Lambda durch einen Schnitt des Restriktionsenzyms HindII, der 34 Basenpaare aufwärts vom RNA-Startpunkt liegt, inaktiviert (Meyer et al., 1975).
In diesem Licht läßt sich das in Abschnitt D.4.2. beschriebene Experiment erklären, in dem die øX174-Restriktionsfragmente Hae III/7 und Taq I/5 mit dem Restriktionsenzym Fnu4H-I in 3 Subfragmente gespalten wurden, was eine Unterdrückung der M.luteus-spezifischen RNA-Synthese zur Folge hatte. Eine Spaltstelle des Enzyms Fnu4H-I, welches spezifisch die Sequenz GCNGC - N bedeutet dabei ein beliebiges Nukleotid - erkennt, liegt nämlich genau in der Position -36 des Promotors ^{m}E (Fig. 39.). Somit ist auch im Falle der M.luteus RNA Polymerase, in Analogie zum E.coli-Enzym, der DNA-Abschnitt aufwärts von Position -35 essentiell für die Promotorfunktion.

Das auffälligste Merkmal des Promotors ^{m}E ist, um auf die oben gestellte Frage zurückzukommen, daß, verglichen mit bekannten E.coli-Promotoren, die Basen G und C sowohl in der -10- als auch der -35-Region überrepräsentiert sind. Man kann diese Beobachtung nun im Zusammenhang sehen mit dem hohen G+C-Gehalt (72 mol%; Schildkraut et al., 1962) von M.luteus-DNA und daraus folgern, daß die Basenspezifität der M.luteus RNA Polymerase in der Enzym-Promotor-Wechselwirkung einem erhöhten GC-Gehalt Rechnung trägt.

Eine Modellvorstellung zum Mechanismus der RNA Polymerase-Promotor-Bindung, die anhand kinetischer Daten kürzlich von Stefano und Gralla (1980) vorgeschlagen und ähnlich von McClure (1980) formuliert wurde, läßt sich auch zur Interpretation der Transkriptionsspezifitäten von M.luteus RNA Polymerase heranziehen.
Dieses Modell beinhaltet die Bildung eines instabilen, intermediären Komplexes aus RNA Polymerase und Promotor, wobei die Promotorregion mit unspezifischen Bindungsstellen auf der DNA um die Komplexbildung konkurriert. Die Ent-

scheidung, ob ein funktionaler Komplex gebildet wird, hängt von der Wahrscheinlichkeit ab, mit der innerhalb der Lebensdauer des Intermediates eine Konformationsänderung stattfindet, worunter im allgemeinen das Aufschmelzen eines kurzen Bereiches der doppelsträngigen DNA verstanden wird.
Eine maßgebliche Rolle in der Modulation der Promotor-Bindungsraten spielt die DNA-Sequenz: zum einen hängt die Dissoziationsrate des intermediären Komplexes von den spezifischen Polymerase-DNA-Kontakten ab und zum anderen bestimmt die thermodynamische Stabilität der Basenpaare die Rate des Aufschmelzens der DNA. Aus der Balance zwischen diesen beiden Größen ergibt sich demnach die "Stärke" eines Promotors.
Unter diesen Aspekten betrachtet, läßt sich der Unterschied der RNA Polymerasen aus E.coli und M.luteus in der Interaktion mit dem Promotor ^{m}E nicht allein auf eine generell höhere DNA-Schmelzrate durch M.luteus Polymerase zurückführen, da sich diese Eigenschaft an allen anderen Promotoren ebenfalls ausdrücken müßte; wie gezeigt, trifft das für die ØX174-Promotoren A, B und D nicht zu. Daher muß man schließen, daß die beiden Polymerase-Spezies verschiedene Optima in der Wechselwirkung des Enzyms mit den einzelnen Basen des Promotors besitzen; das heißt im Sinne des obigen Modells, daß die intermediären Komplexe der beiden Polymerasen mit demselben Promotor unterschiedlich stabil sind.

Wie kann man nun im Rahmen einer solchen Vorstellung das Transkriptionsverhalten des heterologen Enzyms aus E.coli Coreenzym und M.luteus σ einordnen?

Das Enzym-Hybrid katalysiert im Gegensatz zu E.coli Holo- und Core-Polymerase klar erkennbar die Synthese einer am Promotor ^{m}E initiierten RNA. Die Initiationsrate dieser RNA ist etwa halb so groß wie im Falle von M.luteus Holo-Polymerase [4].

Dieses Ergebnis zeigt klar, daß M.luteus σ einen starken Einfluß auf die Transkriptionsspezifität ausübt. Versucht man die Rolle, die die σ-Untereinheit in der Enzym-Promotor-Wechselwirkung spielt, mit Hilfe des geschilderten Modells zu deuten, so bieten sich zunächst 3 Möglichkeiten an:

1) M.luteus σ bewirkt eine spezifische Konformationsänderung in E.coli Core-Polymerase, wodurch die Basenspezifität des Coreenzyms so verändert wird, daß sie mehr derjenigen von M.luteus Holo-Polymerase entspricht.

2) M.luteus σ ist aufgrund direkter Kontakte mit einzelnen Basen in der Promotorregion im wesentlichen für die Promotorerkennung verantwortlich; der Beitrag von E.coli Coreenzym zur Spezifität der Enzym-Promotor-Wechselwirkung ist demgegenüber gering.

3) Der Einfluß der σ-Untereinheit drückt sich vor allem in deren Beteiligung am Vorgang der DNA-Strangtrennung aus. Die Effizienz der σ-Untereinheiten von M.luteus und E.coli RNA Polymerase in dieser Funktion ist verschieden.

Welche Konsequenzen ergeben sich aus den einzelnen Möglichkeiten?
Für den Fall, daß einer der Punkte 1) oder 2) zutrifft, müßte man erwarten, daß der Austausch von E.coli σ durch M.luteus σ zu einer Reduktion der RNA-Initiationsrate an einem Promotor führt, an dem E.coli Polymerase eine höhere Aktivität zeigt als das M.luteus-Enzym.
Der øX174-Promotor A erfüllt für die parentalen Enzyme die

---

4) Ein quantitativer Vergleich der Enzymaktivitäten basiert auf den RNA-Mengen, die im Transkriptionssystem von in äquimolaren Mengen zugesetztem Protein katalytisch gebildet werden, und ist mit Vorbehalt zu betrachten, da der Anteil an katalytisch aktiven Enzymmolekülen in den verschiedenen Präparationen unterschiedlich hoch sein kann.

genannten Voraussetzungen; die von diesem Promotor kontrollierten relativen RNA-Syntheseraten stehen jedoch in klarem Gegensatz zu den Erwartungen: das Enzym-Hybrid übertrifft in der Syntheseaktivität die RNA Polymerase aus E.coli erheblich (Fig. 32.).

Eine zwanglose Interpretation der Transkriptionsspezifität des Enzym-Hybrids ermöglicht hingegen die in Punkt 3) angeführte Annahme, daß spezifische Eigenschaften der σ-Untereinheiten den Ablauf der DNA-Strangtrennung und damit die RNA-Initiationsraten mit bestimmen.

Daß zumindest eine wesentliche Funktion von σ im Aufschmelzen der DNA liegt, legen verschiedene Beobachtungen nahe; so ist die Gegenwart der σ-Untereinheit notwendig für das Schmelzen der DNA durch E.coli RNA-Polymerase während des Initiationsprozesses (Hsieh und Wang, 1978). Weiterhin kann die σ-Untereinheit der E.coli RNA Polymerase kovalent mit einer Base in Position -3 auf dem nichtkodogenen DNA-Strang innerhalb des lac UV5-Promotors verknüpft werden, wenn die Polymerase an diesen Promotor gebunden ist; diese Base befindet sich in dem während der RNA-Initiation einzelsträngig vorliegenden DNA-Abschnitt (Simpson, 1979; Siebenlist et al., 1980).

Unterschiede der σ-Untereinheiten von E.coli und M.luteus RNA Polymerase in ihrer Funktionsweise wären konsistent mit strukturellen Eigenheiten der beiden Proteine: sowohl die elektrophoretischen Mobilitäten im SDS-Gel wie die Nettoladungen (Lill et al., 1977) differieren deutlich.

Auf der Basis des Modells von Stefano und Gralla (1980) kann man nun folgende Hypothese aufstellen:
M.luteus σ übertrifft in der Effizienz des Aufschmelzens der DNA die σ-Untereinheit der E.coli Polymerase; das gilt generell, kommt naturgemäß jedoch bei gehäuftem Auftreten von GC-Basenpaaren besonders stark zum Ausdruck.
Die Core-Polymerasen leisten den Hauptbeitrag zur sequenzabhängigen Enzym-Promotor-Bindung, wobei die Polymerasen aus M.luteus und E.coli, wie diskutiert wurde, unterschied-

liche Optima in den Kontakten mit einzelnen Basen von Promotoren besitzen.

Als Konsequenz daraus folgt, daß die Wahrscheinlichkeit der Stabilisierung des intermediären Enzym-DNA-Komplexes durch die besagte Konformationsänderung, d.h. die Chance, daß ein funktionaler Komplex gebildet wird, durch einen Austausch von E.coli σ gegen M.luteus σ unabhängig von der Nukleotidsequenz des Promotors erhöht wird. Das würde wiederum bedeuten, daß an einem isolierten Promotor die Initiationsrate durch das Enzym-Hybrid ${}^{e}\text{core}{}^{m}\sigma$ stets höher ist als durch E.coli Holo-Polymerase. Betrachtet man unter diesem Blickwinkel die øX174-Promotoren A und ${}^{m}\text{E}$, trifft das in der Tat zu (Fig. 32. und 33.).
Welche Voraussage kann man anhand des Modells für die Syntheseaktivität des Enzym-Hybrids gegenüber M.luteus Polymerase treffen?
An Promotor A ist E.coli Polymerase deutlich aktiver als das M.luteus-Enzym (Fig. 4.). Da dies trotz einer höheren Rate der DNA-Strangtrennung durch M.luteus σ gilt, muß die Lebensdauer des Intermediates aus Enzym und DNA im Falle von E.coli Polymerase erheblich höher sein als bei M.luteus Polymerase. Fügt man zu E.coli Core-Polymerase, die für die Bindungsspezifität verantwortlich ist, die σ-Untereinheit aus M.luteus hinzu, sollte die Aktivität des heterologen Enzyms die der parentalen Enzyme, vor allem des M.luteus-Enzyms, bei weitem übertreffen. Das Ergebnis des entsprechenden Experiments stimmt genau mit dieser Voraussage überein (Fig. 32.).
Ein Beispiel eines Promotors, an dem die Verhältnisse sehr ungünstig für E.coli Polymerase im Vergleich zum M.luteus-Enzym erscheinen, ist der Promotor ${}^{m}\text{E}$. Wie bereits erläutert wurde, könnte dem drastischen Aktivitätsunterschied der beiden Polymerase-Spezies die Summierung zweier Faktoren zugrundeliegen: aufgrund der Spezifität der Enzym-Promotor-Kontakte ist die Dissoziationsrate des instabilen intermediären Komplexes aus Enzym und Promotor-DNA im Falle von M.luteus Polymerase geringer als bei E.coli Polymerase;

gleichzeitig ist die Rate des Schmelzens der DNA durch M.luteus σ höher als durch E.coli σ . Daraus ergibt sich für das Enzym-Hybrid aus E.coli Coreenzym und M.luteus σ eine Reduzierung der Syntheseaktivität gegenüber M.luteus Holo-Polymerase. Auch hier deckt sich also die Folgerung aus der Modellvorstellung qualitativ mit dem experimentellen Resultat (Fig. 33.).

Als weiteres Argument für die hier entwickelten Vorstellungen kann man das Transkriptionsverhalten des Enzym-Hybrids betrachten, wenn man die Aktivität dieses Enzyms an superhelikaler und an linearisierter DNA mit der der parentalen Holoenzyme vergleicht. Die Verwendung der linearen Form III DNA an Stelle der superhelikalen Form I DNA als Matrize zur Transkription hat einen drastischen Rückgang der RNA-Syntheserate durch E.coli und M.luteus Holo-Polymerase zur Folge (Ernst, 1978). Auf die Aktivität des heterologen Enzyms $^{e}core^{m}\sigma$ hingegen wirkt sich die Strukturänderung der DNA-Matrize weit weniger stark aus (Ernst, 1978). Die erhöhte Aktivität der RNA Polymerase an Form I DNA wird im allgemeinen einem durch die negative Superhelizität erleichterten Schmelzen der DNA während des Initiationsprozesses zugeschrieben (Wang, 1974). Damit wäre die Schwächung des Einflusses der DNA-Überstruktur auf die Transkriptionsaktivität, wie sie bei dem untersuchten Enzym-Hybrid gefunden wird, eine Folge der hohen Effizienz von M.luteus σ in der DNA-Strangtrennung. Gleichzeitig muß man dann auch fordern, daß zwischen den Core-Polymerasen aus E.coli und M.luteus klare Unterschiede in der Enzym-Promotor-Bindung bestehen.

Literaturverzeichnis

Axelrod, N. (1976a) "Transcription of Bacteriophage øX174 in vitro: Selective Initiation with Oligonucleotides", J. Mol. Biol. 108, 753 - 770

Axelrod, N. (1976b) "Transcription of Bacteriophage øX174 in vitro: Analysis with Restriction Enzymes", J. Mol. Biol. 108, 771 - 779

Barrell, B. G., Air, G. M. and Hutchison, C. A. III (1976) "Overlapping genes in bacteriophage øX174", Nature 264, 34 - 41

Belozersky, A. N. and Spirin, A. S. (1960) "Chemistry of the Nucleic Acids of Microorganisms", in "The Nucleic Acids" (Chargaff, E. and Davidson, J. N. eds.), Academic Press, New York and London, pp. 147 - 185

Berg, D., Barrett, K. and Chamberlin, M.J. (1971) "Purification of Two Forms of Escherichia coli RNA Polymerase", in "Methods in Enzymology" (Grossmann, L. and Moldave, K. eds.), Academic Press, New York and London, Vol. XXI, pp. 506 - 519

Botchan, P. (1976) "An electron microscopic comparison of transcription on linear and superhelical DNA", J. Mol. Biol. 105, 161 - 176

Bremer, H. (1970) "Influence of KCl on the in vitro Transcription of T4 DNA". Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 35, 109 - 119

Brown, N. L. and Smith, M. (1976) "The mapping and sequence determination of the single site in øX174 am3 Replicative Form DNA cleaved by Restriction Endonuclease Pst I", FEBS Lett. 65, 284 - 287

Bujard, H. (1980) "The interaction of E.coli RNA polymerase with promoters", TIBS Vol.5, 274 - 278

Burgess, R. R., Travers, A. A., Dunn, J. J. and Bautz, E.K.F. (1969) "Factor Stimulating Transcription by RNA Polymerase", Nature 221, 43 - 46

Calos, M. P. (1978) "DNA sequence for a low-level promoter of the lac repressor gene and an "up"promotor mutation", Nature 274, 762 - 765

Cech, C. L. and McClure, W. R. (1980) "Characterization of Ribonucleic Acid Polymerase - T7 Promoter Binary Complexes", Biochemistry 19, 2440 - 2447

Chamberlin, M. J., Niermann, W. C., Wiggs, J. and Neff, N. (1979) "A Quantitative Assay for Bacterial RNA Polymerases", J. Biol. Chem., 254, 10061 - 10069

Dausse, J.-P., Sentenac, A. and Fromageot, P. (1976) "Interaction of RNA Polymerase from Escherichia coli with DNA. Effect of Temperature and Ionic Strength on Selection of T7 DNA Early Promoters", Eur. J. Biochem. 65, 387 - 393

Davison, B. L., Leighton, T. and Rabinowitz, J. C. (1979) "Purification of Bacillus subtilis RNA Polymerase with Heparin-Agarose. In vitro Transcription of ø29 DNA", J. Biol. Chem. 254, 9220 - 9226

Davison, B. L., Murray, C. L., and Rabinowitz, J. C. (1980) "Specificity of Promoter Site Utilization in Vitro by Bacterial RNA Polymerases on Bacillus Phage ø29 DNA", J. Biol. Chem. 255, 8819 - 8830

Denhart, D. (1966) "A membrane filter technique for the detection of complementary DNA", Biochem. Biophys. Res. Commun. 23, 641 - 646

Domdey, H. (1979) "Nukleotidsequenz und Sekundärstruktur des Viroids der Spindelknollensucht der Kartoffel (potato spindle tuber viroid, PSTV), Dissertation, Universität München

Domdey, H. (1980) "Sequenzanalyse von Nucleinsäuren", Chemie i. u. Zeit 1, 14. Jahrg., 1 - 12

Donis-Keller, H., Maxam, A. M. and Gilbert, W. (1977) "Mapping adenines, guanines, and pyrimidines in RNA", Nucleic Acids Res. 4, 2527 - 2538

Downey, K. M. and So, A. G. (1970) "Studies on the Kinetics of Ribonucleic Acid Chain Initiation and Elongation", Biochemistry 9, 2520 - 2525

Downey, K. M., Jurmark, B. S. and So, A. G. (1971) "Determination of Nucleotide Sequences at Promoter Regions by the Use of Dinucleotides", Biochemistry 10, 4970 - 4975

Edlind, T. D. and Ihler, G. M. (1980) "Long Range Base Pairing in Bacteriophage øX174 Single Stranded DNA", J. Mol. Biol. 142, 131 - 144

Ernst, H. (1978) "Untersuchungen über die Transkriptionsspezifität der DNA-abhängigen RNA-Polymerasen aus Escherichia coli und Micrococcus luteus und den Einfluß der Sigma-Untereinheit in vitro", Diplomarbeit, Universität München

Fuchs, E., Millette, R. L., Zillig, W. and Walter, G. (1967) "Influence of Salts on RNA Synthesis by DNA-Dependent RNA Polymerase from Escherichia coli", Eur. J. Biochem. 3, 183 - 193

Gabain, A. and Bujard, H. (1977) "Interaction of E.coli RNA Polymerase with Promoters of Coliphage T5", Molec. Gen. Genet. 157, 301 - 311

Gilbert, W. (1976) "Starting and Stopping Sequences for the RNA Polymerase", in "RNA Polymerase" (Losick, R. and Chamberlin, M. J. eds.), Cold Spring Harbor Laboratory, New York, pp. 193 - 205

Gillum, A. M., Urquhardt, N., Smith, M. and RajBhandary, U. L. (1975) "Nucleotide Sequence of Salmon Testes and Salmon Liver Cytoplasmic Initiator tRNA", Cell 6, 395 - 405

Gross, H. J., Domdey, H., Lossow, C., Jank, P., Raba, M., Alberty, H. and Sänger, H. L. (1978) "Nucleotide sequence and secondary structure of potato spindle tuber viroid", Nature 273, 203 - 208

Hartmann, G. R. (1976) "Exchange in vitro of Subunits between Enzymes from Different Organisms: Chimeras of Enzymes", Angew. Chemie, Internat. Edit., 15, 181 - 186

Hayashi, M., Hayashi, M. N. and Spiegelman, S. (1963) "Restriction of in vivo genetic transcription to one of the complementary strands of DNA", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 50, 664 - 672

Hayashi, M., Fujimura, F. K. and Hayashi, M. (1976) "Mapping of in vivo messenger RNAs for bacteriophage øX174", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 3519 - 3523

Hsieh, T. and Wang, J. C. (1978) "Physicochemical studies on interactions between DNA and RNA polymerase. Ultraviolet absorption measurements", Nucleic Acids Res. 5, 3337 - 3345

Hutchison III, C. A. and Sinsheimer, R. L. (1966) "The Process of Infection with Bacteriophage øX174. X. Mutations in a øX Lysis Gene", J. Mol. Biol. 18, 429 - 447

Iida, H., Ikehara, K. and Okada, Y. (1979) "Differential transcription of fd RF I DNA by Caulobacter crescentus and Escherichia coli RNA polymerases", FEBS Lett. 99, 346 - 350

Jay, E., Bambara, R., Padmanabhan, R. and Wu, R. (1974) "DNA sequence analysis: a general, simple and rapid method for sequencing large oligodeoxyribonucleotide fragments by mapping", Nucleic Acids Res. 1, 331 - 353

Jeppesen, P. G. N., Sanders, L. and Slocombe, P. M. (1976) "A restriction cleavage map of øX174 DNA by pulse-chase labelling using E.coli DNA polymerase", Nucleic Acids Res. 3, 1323 - 1339

Johnston, D. E. and McClure, W. R. (1976) "Abortive Initiation of in vitro RNA Synthesis on Bacteriophage λ DNA", in "RNA Polymerase" (Losick, R. and Chamberlin, M. J., eds.), Cold Spring Harbor Laboratory, New York, pp. 413 - 428

Jones, B. B., Chan, H., Rothstein, S., Wells, R. D. and Reznikoff, W. S. (1977) "RNA polymerase binding sites in λplac5 DNA", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 4914 - 4918

Jones, O. W. and Berg, P. (1966) "Studies on the Binding of RNA Polymerase to Polynucleotides", J. Mol. Biol. 22, 199 - 209

Kapitza, E. L., Stukacheva, E. A. and Shemyakin, M. F. (1979) "Effect of Escherichia coli ρ Factor and RNase III on the formation of øX174 RNA in vitro", FEBS Lett. 98, 123 - 127

Krupp, G. and Gross, H. J. (1979) "Rapid RNA sequencing: nucleases from Staphylococcus aureus and Neurospora crassa discriminate between uridine and cytidine", Nucleic Acids Res. 6, 3481 - 3490

Lechner, S. (1980) "Vergleichende Untersuchungen über die Abdissoziation der Sigma-Untereinheit von der Micrococcus luteus und Escherichia coli RNA-Polymerase", Dissertation, Universität München

Ledeboer, A. M., Hille, J. and Schilperoort, R. A. (1978) "An easy and efficient procedure for the isolation of pure DNA restriction fragments from Agarose Gels", Biochim. Biophys. Acta, 520, 498 - 504

Lee, A. S. and Sinsheimer, R. L. (1974) "A Cleavage Map of Bacteriophage øX174 Genome", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 2882 - 2886

Lee, G., Talkington, C. and Pero, J. (1980) "Nucleotide Sequence of a Promotor Recognized by Bacillus subtilis RNA Polymerase", Molec. Gen. Genet. 180, 57 - 65

Leib, C. (1979) "Vergleich der DNA-abhängigen RNA-Polymerase aus Micrococcus luteus und Escherichia coli mit peptid- und immunchemischen Methoden, Dissertation, Universität München

Leib, C., Ernst, H. and Hartmann, G. R. (1980) "Recognition of Promoter Sequences by RNA Polymerases from Different Sources", in "Molecular Biology, Biochemistry and Biophysics" (A. Kleinzeller, G. F. Springer and H. G. Wittmann, eds.), Vol. 32 (Chemical Recognition in Biology (F. Chapeville and A.-L. Haenni, eds.)), Springer-Verlag Berlin - Heidelberg - New York 1980, pp. 301 - 307

Lill, U. I., Behrendt, E. M. and Hartmann, G. R. (1975) "Hybridization in vitro of Subunits of the DNA-Dependent RNA Polymerase from Escherichia coli and Micrococcus luteus", Eur. J. Biochem. 52, 411 - 420

Lill, U. I., Kniep-Behrendt, E. M., Bock, L. and Hartmann, G. R. (1977) "Purification and Characterization of the DNA-Dependent RNA Polymerase and its Subunit σ from Micrococcus luteus", Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 358, 1591 - 1603

Lowe, P. A., Hager, D. A. and Burgess, R. R. (1979) "Purification and Properties of the σ Subunit of Escherichia coli DNA-Dependent RNA Polymerase", Biochemistry 7, 1344 - 1352

Maitra, U. and Hurwitz, J. (1965) "The role of DNA in RNA synthesis.IX. Nucleoside triphosphate termini in RNA polymerase products", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 54, 815 - 822

Maitra, U., Lockwood, A. H., Dubnoff, J. S. and Guha, A. (1970) "Termination, Release, and Reinitiation of RNA Chains from Templates by Escherichia coli RNA Polymerase", Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 35, 143 - 156

Maizels, N. M. (1973) "The Nucleotide Sequence of the Lactose Messenger Ribonucleic Acid Transcribed from the UV5 Promoter Mutant of Escherichia coli", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 3585 - 3589

Mangel, W. F. and Chamberlin, M. J. (1974) "Studies of Ribonucleic Acid Chain Initiation by Escherichia coli RNA Polymerase Bound to T7 Deoxyribonucleic Acid. II. The Effect of Alterations in Ionic Strength on Chain Initiation and on the Conformation of Binary Complexes", J. Biol. Chem. 249, 3002 - 3006

Maxam, A. M. and Gilbert, W. (1977) "A new method for sequencing DNA", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 560 - 564

McClure, W. R (1980) "Rate-limiting steps in RNA chain initiation", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 5634 - 5638

Meyer, B. J., Kleid, D. G. and Ptashne, M. (1975) "λ Repressor turns off its own gene", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 4785 - 4789

Miller, J. S. and Burgess, R. R. (1978) "Selectivity of RNA Chain Initiation in Vitro. 3. Variables Affecting Initiation of Transcription", Biochemistry 17, 2064 - 2069

Millette, R. L., Trotter, C. D., Herrlich, P. and Schweiger, M. (1970) "In vitro Synthesis, Termination, and Release of Active Messenger RNA", Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 35, 135 - 142

Minkley, E. G. and Pribnow, D. (1973) "Transcription of the Early Region of Bacteriophage T7: Selective Initiation with Dinucleotides", J. Mol. Biol. 77, 255 - 277

Peacock, A. C. and Dingman, C. W. (1968) "Molecular Weight Estimation and Separation of Ribonucleic Acid by Electrophoresis in Agarose - Acrylamide Composite Gels", Biochemistry 7, 668 - 674

Peattie, D. A. (1979) "Direct chemical method for sequencing RNA", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 1760 - 1764

Pribnow, D. (1975) "Bacteriophage T7 Early Promoters: Nucleotide Sequences of Two RNA Polymerase Binding Sites", J. Mol. Biol. 99, 419 - 443

Richardson, J. P. (1971) "Rho factor function in T4 RNA transcription", Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 35, 121 - 133

Robley, C. W. and Fisher, H. W. V. (1980) "Preferential Binding Sites of E.coli RNA-Polymerase to øX174 Replicative Form DNA", J. Mol. Biol. 140, 435 - 439

Rosenberg, M. and Court, D. (1979) "Regulatory Sequences Involved in the Promotion and Termination of RNA Transcription", Annu. Rev. Genet. 13, 319 - 353

Rüger, W. (1978) "Transcription of Bacteriophage T4 DNA in vitro: Selective Initiation with Dinucleotides", Eur. J. Biochem. 88, 109 - 117

Sanger, F., Brownlee, G.G. and Barrell, B. G. (1965) "A Two-dimensional Fractionation Procedure for Radioactive Nucleotides", J. Mol. Biol. 13, 373 - 398

Sanger, F., Air, G. M., Barrell, B. G., Brown, N. L., Coulson, A. R., Fiddes, J. C., Hutchison III, C. A., Slocombe, P. M. and Smith, M. (1977) "Nucleotide sequence of bacteriophage øX174 DNA", Nature 265, 687 - 695

Sanger, F., Coulson, A. R., Friedmann, T., Air, G. M., Barrell, B. G., Brown, N. L., Fiddes, J. C., Hutchison III, C. A., Slocombe, P. M. and Smith, M. (1978) "The Nucleotide Sequence of Bacteriophage øX174", J. Mol. Biol. 125, 225 - 246

Schaller, H., Gray, C. and Herrmann, K. (1975) "Nucleotide Sequence of an RNA Polymerase Binding Site from the DNA of Bacteriophage fd", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 737 - 741

Schildkraut, C. L., Marmur, J. and Doty, P. (1962) "Determination of the Base Composition of Deoxyribonucleic Acid from its Buoyant Density in CsCl", J. Mol. Biol. 4, 430 - 443

Seeburg, P. H., Nüsslein, C. and Schaller, H. (1977) "Interaction of RNA Polymerase with Promoters from Bacteriophage fd", Eur. J. Biochem. 74, 107 - 113

Siebenlist, U. (1979) "RNA polymerase unwinds an 11-base pair segment of a phage T7 promoter", Nature 279, 651 - 652

Siebenlist, U., Simpson, R. B. and Gilbert, W. (1980) "E.coli RNA Polymerase Interacts Homologously with Two Different Promoters", Cell 20, 269 - 281

Simoncsits, A., Brownlee, G. G., Brown, R. S., Rubin, J.R. and Guilley, H. (1977) "New rapid gel sequencing method for RNA", Nature 269, 833 - 836

Simpson, R. B. (1979) "The Molecular Topography of RNA Polymerase - Promoter Interaction", Cell 18, 277 - 285

Smith, L. H. and Sinsheimer, R. L. (1976) "The in vitro Transcription Units of Bacteriophage øX174", J. Mol. Biol. 103, 699 - 735

Southern, E. M. (1975) "Detection of Specific Sequences Among DNA Fragments Separated by Gel Electrophoresis", J. Mol. Biol. 98, 503 - 517

Spiegelman, G. B. and Whiteley, H. R. (1978) "Bacteriophage SP82 Induced Modifications of Bacillus subtilis RNA Polymerase Result in the Recognition of Additional RNA Synthesis Initiation Sites on Phage DNA". Biochem. Biophys. Res. Commun. 81, 1058 - 1065

Stefano, J. E. and Gralla, J. D. (1980) "Kinetic Investigation of the Mechanism of RNA Polymerase Binding to Mutant lac Promoters", J. Biol. Chem. 255, 10423 - 10430

Stüber, D. und Bujard, H. (1979) "Elektronenmikroskopische Analyse von In-vitro-Transkriptionskomplexen an superhelikaler DNA", Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 360, 383 - 384

Talkington, C. and Pero, J. (1978) "Promoter recognition by phage SP01-modified RNA polymerase", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 1185 - 1189

Talkington, C. and Pero, J. (1979) "Distinctive nucleotide sequences of promoters recognized by RNA polymerase containing a phage-coded "σ-like" protein", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 5465 - 5469

Tomizawa, J.I., Sakakibara, Y. and Kakefuda, T. (1974) "Replication of Colicin E1 Plasmid DNA in Cell Extracts. Origin and direction of Replication", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 2260 - 2264

Travers, A. A. and Burgess, R. R. (1969) "Cyclic re-use of the RNA polymerase sigma factor", Nature 222, 537 - 540

Tu, C.-P. D. and Wu, R. (1980) "Sequence Analysis of Short DNA Fragments" in "Methods in Enzymology" (Grossman, L. and Moldave, K., eds.), Vol. 65 Nucl. Acids, Part I, pp. 620 - 638

Walter, G., Zillig, W., Palm, P. and Fuchs, E. (1967) "Initiation of DNA-Dependent RNA Synthesis and the Effect of Heparin on RNA Polymerase", Eur. J. Biochem. 3, 194 - 201

Wang, J. C. (1974) "Interactions between Twisted DNAs and Enzymes: The Effects of Superhelical Turns", J. Mol. Biol. 87, 797 - 816

Wiggs, J. L., Bush, J. W. and Chamberlin, M. J. (1979) "Utilization of Promoter and Terminator Sites on Bacteriophage T7 DNA by RNA Polymerases from a Variety of Bacterial Orders", Cell 16, 97 - 109

Zillig, W., Zechel, K., Rabussay, D., Schachner, M., Sethi, V. S., Palm, P., Heil, A. and Seifert, W. (1970) "On the Role of Different Subunits of DNA-Dependent RNA Polymerase from E.coli in the Transcription Process", Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 35, 47 - 58

Zusammenfassung

1. Die RNA Polymerase aus dem grampositiven Bakterium Micrococcus luteus erkennt Promotoren der E.coli RNA Polymerase und kann dort die Synthese diskreter RNA-Spezies initiieren. Dies konnte durch vergleichende Transkription isolierter Restriktionsfragmente der RF DNA des Bakteriophagen øX174, die bekannte Promotoren der E.coli RNA Polymerase tragen, mit M.luteus- und E.coli RNA Polymerase und gelelektrophoretische Analyse der Transkripte gezeigt werden. Die Effizienz, mit der M.luteus Polymerase die an diesen Promotoren initiierte RNA-Synthese katalysiert, beträgt ca. 20 - 30 % der Effizienz des E.coli-Enzyms.

2. Durch Analyse von Komplexen aus øX174-Restriktionsfragmenten mit den RNA Polymerasen aus M.luteus und E.coli wurde demonstriert, daß zwischen den beiden Polymerasen deutliche Unterschiede quantitativer Art in der Enzym-Promotor-Wechselwirkung bestehen. Dabei konnte ein DNA-Fragment (Hae III/7) ermittelt werden, das aufgrund seiner starken Tendenz zur spezifischen Komplexbildung mit M.luteus RNA Polymerase hervorragt.

3. Die Transkription des isolierten øX174-Restriktionsfragments Hae III/7 durch M.luteus RNA Polymerase liefert eine einzige distinkte RNA; im Gegensatz dazu vermag E.coli RNA Polymerase unter denselben Bedingungen nur weniger als 1.3 % der Menge dieser RNA-Spezies zu synthetisieren, die durch M.luteus Polymerase erzeugt wird. Die Speziesspezifität der Ablesung ist unabhängig von der im Transkriptionsansatz herrschenden Salzkonzentration. Durch Bestimmung

der Längen von "run off"-Transkripten unterschiedlich langer Restriktionsfragmente, die alle die Startstelle der spezifisch erzeugten RNA enthalten, und Sequenzierung des 5'-Endes dieser RNA konnte die Promotorregion lokalisiert werden. Der Vergleich der Nukleotidsequenz dieses Promotors mit bekannten Sequenzen von E.coli-Promotoren ergibt als charakteristisches Merkmal des M.luteus-Promotors einen signifikant höheren G+C-Gehalt in DNA-Abschnitten, die als essentiell für die Wirkung eines E.coli-Promotors gelten.

4. Ein Enzym-Hybrid aus E.coli Core-Polymerase und der Sigma-Untereinheit aus M.luteus katalysiert im Gegensatz zu E.coli Core- bzw. Holo-Polymerase mit dem ØX174-Fragment Hae III/7 als Matrize klar die Synthese einer RNA, die mit dem M.luteus-spezifischen Hae III/7-Transkript identisch ist. Die Syntheserate durch das Enzym-Hybrid ist dabei etwa halb so groß wie durch M.luteus Holo-Polymerase. Durch Zugabe von E.coli Sigma-Untereinheit zu dem heterologen Enzym kann die spezifische RNA-Synthese fast vollständig unterdrückt werden. Dies ist ein direkter Hinweis auf eine maßgebliche Rolle der Sigma-Untereinheit beim Prozess der promotorspezifischen RNA-Initiation.

Abkürzungsverzeichnis

^{m}h, $^{m}holo$	RNA Polymerase Holoenzym aus M.luteus
$^{m}\sigma$	Untereinheit σ der M.luteus RNA Polymerase
^{e}h, $^{e}holo$	RNA Polymerase Holoenzym aus E.coli
^{e}c, $^{e}core$	RNA Polymerase Coreenzym aus E.coli
$^{e}\sigma$	Untereinheit σ der E.coli RNA Polymerase
E.coli	Escherichia coli
M.luteus	Micrococcus luteus
T_D	RNA-Transkript eines Taq I-Restriktionsfragments, das den Startbereich des øX174-Gens D enthält
H_D	RNA-Transkript eines Hae III-Restriktionsfragments, das den Startbereich des øX174-Gens D enthält
T_E, H_E, M_E	RNA-Transkripte von Taq I-, Hae III- oder Mbo II-Restriktionsfragmenten, die jeweils den Startbereich des øX174-Gens E enthalten
T_E', H_E'	RNA-Transkripte mit gleicher Mobilität im Gel wie T_E bzw. H_E
e_A, e_B, e_D	Promotoren der E.coli RNA Polymerase vor den øX174-Genen A, B oder D
m_E	Promotor der M.luteus RNA Polymerase im øX174-Gen E
TEP-Puffer	Tris - EDTA - Phosphat -Puffer pH 7.7 (vgl. Seite 11)
TEB-Puffer	Tris - EDTA - Borat -Puffer pH 8.3 (vgl. S. 21.)
TMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Standard saline citrate: 0.15 mol NaCl/l, 0.015 mol Na-citrat/l
RF I DNA	kovalent geschlossene Replikative Form DNA
% w/v; % v/v	Gewichtsprozent; Volumenprozent

Lebenslauf

Name	Heinrich E r n s t
geb. am	12. September 1950 in Pähl
Eltern	Heinrich Ernst Anneliese Ernst, geb. Mayr
1956 - 1961	Volksschule, Machtlfing
1961 - 1970	Carl-von-Linde-Gymnasium (humanistisch), Kempten
1970	Abitur
1970 - 1971	Studium der Chemie an der Technischen Universität München
1971 - 1972	Ableistung des Grundwehrdienstes in Starnberg
1973 - 1975	Fortsetzung des Studiums der Chemie an der Technischen Universität München
1975 - 1977	Studium der Chemie an der Universität München
April 1977	Diplom-Hauptprüfung
Juni 1977 - April 1978	Anfertigung der Diplomarbeit am Institut für Biochemie der Universität München unter Anleitung von Prof. Dr. G. Hartmann
April 1978	Diplom in Chemie
seit Mai 1978	Anfertigung der Doktorarbeit am Institut für Biochemie der Universität München unter Anleitung von Prof. Dr. G. Hartmann